

# 鸟氨酸脱羧酶和谷氨酸脱羧酶 65 在鼻腔鼻窦良恶性病变中的表达及意义

李友忠,葛圣雷,杨新明,卢永德

## Expression and Clinicopathological Significance of Ornithine Decarboxylase and Glutamate Decarboxylase 65 in Benign and Malignant Lesions of Rhinosinus

LI You-zhong, GE Sheng-lei, YANG Xin-ming, LU Yong-de

Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

**Abstract: Objective** To investigate the expressive levels of ODC and GAD65, and detect their clinicopathological significances in the benign and malignant lesions of rhinosinus. **Methods** EnVision immunohistochemical method was used for determining expression levels of ODC and GAD65 in the routinely paraffin-embedded sections from specimens of adenocarcinoma of rhinosinus and peritumoral tissues ( $n = 67$ ), sinonasal inverted papillomas ( $n = 48$ ), and chronic sinusitis and nasal polyps ( $n = 35$ ). **Results** The positive expression rates of ODC and GAD65 in adenocarcinoma of rhinosinus (73.1%, 61.2%) were significantly higher than those in peritumoral tissues (28.4%,  $\chi^2 = 17.26, P < 0.01$ ; 20.9%,  $\chi^2 = 13.28, P < 0.01$ ), sinonasal inverted papillomas (20.8%,  $\chi^2 = 8.66, P < 0.01$ ; 27.1%,  $\chi^2 = 5.10, P < 0.05$ ), and chronic sinusitis and nasal polyps (11.4%,  $\chi^2 = 28.28, P < 0.01$ ; 17.1%,  $\chi^2 = 14.98, P < 0.01$ ). The positive rates of ODC and GAD65 in highly-differentiated adenocarcinoma, no-metastasis of lymphnode, no-infiltration of regional tissues or organs (T2N0M0) were significantly lower than those in low-differentiated adenocarcinoma, metastasis of lymphnode, infiltration of regional tissues or organs (T3N0M0, T4N1M0) ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Changes of enzymatic activity of ODC and GAD65 might be important biological markers for reflecting the carcinogenesis, progression, biological behaviors and prognosis of adenocarcinoma of rhinosinus.

**Key words:** Adenocarcinoma of rhinosinus; Ornithine decarboxylase; Glutamate decarboxylase 65; Immunohistochemistry

**摘要:目的** 研究鼻腔鼻窦腺癌、癌旁组织、鼻内翻性乳头状瘤和慢性鼻窦炎鼻息肉中鸟氨酸脱羧酶(ODC)和谷氨酸脱羧酶 65(GAD65)的表达水平及其临床病理意义。**方法** 67 例鼻腔鼻窦腺癌及癌旁组织、48 例鼻内翻性乳头状瘤和 35 例慢性鼻窦炎鼻息肉常规制作石蜡包埋切片,ODC 和 GAD65 染色方法为 EnVision 免疫组织化学法。**结果** 鼻腔鼻窦腺癌 ODC 和 GAD65 表达阳性率(73.1%,61.2%)明显高于癌旁组织(28.4%, $\chi^2 = 17.26, P < 0.01$ ;20.9%, $\chi^2 = 13.28, P < 0.01$ )、鼻内翻性乳头状瘤(20.8%, $\chi^2 = 8.66, P < 0.01$ ;27.1%, $\chi^2 = 5.10, P < 0.05$ )和慢性鼻窦炎鼻息肉(11.4%, $\chi^2 = 28.28, P < 0.01$ ;17.1%, $\chi^2 = 14.98, P < 0.01$ )。鼻腔鼻窦高分化腺癌,未侵犯鼻腔和鼻窦外周组织及淋巴结未转移病例(临床分型 T2N0M0)ODC 和 GAD65 表达阳性率明显低于鼻腔鼻窦中分化和低分化腺癌,侵犯鼻腔和鼻窦外周组织及淋巴结有转移病例(临床分型 T3N0M0、T4N1M0)( $P < 0.01$ )。**结论** ODC 和 GAD65 酶活性改变可能是反映鼻腔鼻窦腺癌发生、进展、生物学行为及预后的重要酶学指标。

**关键词:**鼻腔鼻窦腺癌;鸟氨酸脱羧酶;谷氨酸脱羧酶 65;免疫组织化学

中图分类号:R739.62;Q55 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2009)12-1020-04

### 0 引言

鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)

为多胺合成过程中的第一限速酶,多胺是机体内广泛存在的一类脂肪族多价阳离子,调控细胞的生长、增殖、分裂和分化<sup>[1]</sup>。近年研究发现 ODC 活性变化与一些恶性肿瘤发生、进展、生物学行为及预后密切相关<sup>[2-5]</sup>。谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)有两种异构体(GAD65 和 GAD67),二者与 r-

收稿日期:2008-06-30;修回日期:2009-07-24

作者单位:410011 长沙,中南大学湘雅二院耳鼻咽喉科

作者简介:李友忠(1963-),男,博士,副教授,主要从事耳鼻咽喉科基础和临床研究

氨基丁酸能系统的功能存在密切关系,是合成关键酶<sup>[6-7]</sup>。近年发现 GAD65 活性改变,与一些恶性肿瘤进展及预后密切相关<sup>[8-10]</sup>。作者应用 EnVision 免疫组织化学方法研究鼻腔鼻窦腺癌、鼻内翻性乳头状瘤和慢性鼻窦炎鼻息肉组织中 ODC 和 GAD65 表达水平及其临床病理意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本及临床病理资料

收集我院 1995 年 10 月~2006 年 7 月鼻腔鼻窦腺癌手术后标本 67 例,男 42 例(62.7%),女 25 例(37.3%)。年龄 18~76 岁,平均年龄 44.6 岁。病理类型均为腺癌,其中高分化腺癌 35 例(腺样囊性癌 24 例、黏液表皮样癌 11 例);中分化腺癌 14 例;低分化腺癌 18 例。根据国际抗癌联盟的鼻腔鼻窦癌临床分类(TNM 分类分期法)分为 T2N0M0 17 例;T3N0M0 31 例;T4N1M0 19 例。手术方法:上颌骨次全切 17 例;颅面联合手术 2 例;鼻侧切开鼻腔鼻窦肿瘤摘除 28 例;鼻内镜下鼻腔鼻窦肿瘤摘除 22 例。以上 67 例鼻腔鼻窦腺癌均取癌旁组织(距癌组织边缘 $\geq$ 3 mm)。颈淋巴结廓清术 19 例。另收集 2003 年 2 月~2006 年 9 月鼻内翻性乳头状瘤 48 例,其中男性 33 例,女性 15 例,年龄 28~68 岁,平均年龄 49.4 岁;病理证实均为内翻性乳头状瘤,其中中~重度不典型增生 39 例(81.3%)。2006 年 1~9 月取 35 例慢性鼻窦炎鼻息肉术后组织标本作为对照。以上标本经 4% 甲醛固定后常规制作石蜡包埋,切片厚 4  $\mu$ m。

### 1.2 主要试剂

兔抗人 ODC 和 GAD65 多克隆抗体购自武汉博士德公司,EnVision<sup>TM</sup> 染色试剂盒购自上海基因技术有限公司。

### 1.3 方法

ODC 和 GAD65 染色方法均为 EnVision 免疫组化法,严格按试剂说明书操作,主要步骤如下:切片脱蜡至水洗 $\rightarrow$ 3%  $H_2O_2$  甲醇液 10 min $\rightarrow$ 胰蛋白酶消化 15 min $\rightarrow$ 滴一抗 37  $^{\circ}C$  孵育 60 min $\rightarrow$ 滴 A 液 37  $^{\circ}C$  孵育 30 min $\rightarrow$ 显色液显色 15 min $\rightarrow$ 苏木精浅染 1 min $\rightarrow$ 脱水,透明和中性树胶封固。细胞质内含棕黄色颗粒者为 ODC 和 GAD65 阳性细胞,随机观察切片中 10 个高倍视野阳性细胞率,其阳性细胞率均值 $\geq$ 25%为阳性病例, $<$ 25%为阴性病例。以武汉博士德公司提供的阳性切片作为阳性对照,以 0.01 mol/L PBS 液(pH 7.4)替代一抗作为阴性对照。

### 1.4 统计学方法

将所得数据输入 SPSS 13.0 统计软件包行  $\chi^2$  检验及 Fisher's 精确概率法,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 ODC 和 GAD65 在鼻腔鼻窦良恶性病变中的表达

ODC 在细胞质内表达,呈棕黄色颗粒,阳性细胞率 $>$ 50%。细胞核增大,无分裂,见图 1。67 例鼻腔鼻窦腺癌 ODC 表达阳性病例为 49 例(73.1%)。GAD65 在细胞质内表达,为棕黄色颗粒,阳性细胞率 $>$ 40%,细胞核无染色,无分裂,见图 2。GAD65 表达阳性病例为 41 例(61.2%)。67 例癌旁组织 ODC 和 GAD65 表达阳性病例分别为 19 例(28.4%)和 14 例(20.9%)。48 例鼻内翻性乳头状瘤两者阳性表达分别为 10 例(20.8%)和 13 例(27.1%),35 例慢性鼻窦炎鼻息肉中两者阳性表达分别为 4 例(11.4%)和 6 例(17.1%)。鼻腔鼻窦腺癌 ODC 和 GAD65 表达阳性率均明显高于癌旁组织( $\chi^2 = 17.26, P < 0.01; \chi^2 = 13.28, P < 0.01$ )、鼻内翻性乳头状瘤( $\chi^2 = 8.66, P < 0.01; \chi^2 = 5.10, P < 0.05$ )和慢性鼻窦炎鼻息肉( $\chi^2 = 28.28, P < 0.01; \chi^2 = 14.98, P < 0.01$ );且鼻内翻性乳头状瘤和慢性鼻窦炎鼻息肉 ODC 和 GAD65 表达阳性病例均伴有中或重度不典型增生,无 1 例正常鼻腔鼻窦黏膜有阳性表达。

### 2.2 ODC 和 GAD65 表达与鼻腔鼻窦腺癌临床病理特征的关系

鼻腔鼻窦腺癌中高分化腺癌(腺样囊性癌 24 例、黏液表皮样癌 11 例)、无淋巴结转移且未侵犯周围组织(临床分型 T2N0M0)的病例 ODC 和 GAD65 表达阳性率明显低于低分化腺癌、淋巴结转移及侵犯周围组织(临床分型 T3N0M0, T4N1M0)的病例,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),ODC 和 GAD65 表达与鼻腔鼻窦腺癌患者性别、年龄、肿块大小及有无其他并发症等临床特征无明显关系( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2.3 ODC 和 GAD65 表达与鼻腔鼻窦腺癌术后生存关系

67 例鼻腔鼻窦腺癌患者,手术后随访 5 年以上,T2N0M0 17 例术后生存 4.2~5.7 年(平均 5.3 年);T3N0M0 31 例术后生存 1.2~3.5 年(平均 2.2 年);T4N1M0 19 例术后生存 6~14 月(平均 9 月),鼻腔鼻窦腺癌中高分化腺癌,无淋巴结转移且未侵犯周围组织的患者 ODC (60.0%) 和 GAD65 (48.6%) 表达阳性率相对较低,且在高倍视野阳性细胞率均值为 25%~35%,术后预后好,生存时间长。中分化和低分化腺癌、淋巴结转移及侵犯周围组织的患者 ODC (85.7%, 88.9%) 和 GAD65 (71.4%, 77.8%) 表达阳性率相对高,且在高倍视野

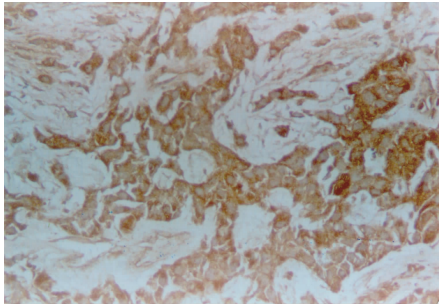


图 1 ODC 在鼻腔鼻窦中分化腺癌中的阳性表达 (EnVision × 200)

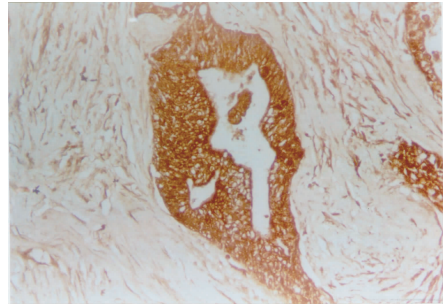


图 2 GAD65 在鼻腔鼻窦高分化腺癌中的阳性表达 (EnVision × 200)

Figure 1 Positive expression of ODC in moderately-differentiated adenocarcinoma of sinonasal, (EnVision × 200)

Figure 2 Positive expression of GAD65, well-differentiated adenocarcinoma of sinonasal, (EnVision × 200)

表 1 鼻腔鼻窦腺癌中 ODC 和 GAD 65 的表达与临床病理特征的关系

Table 1 Relationship expression of ODC and GAD65 with clinicopathological significance in adenocarcinoma of rhinosinus

Clinicopathological significance	Cases	ODC(cases)			GAD65(cases)		
		Positive(%)	$\chi^2$	P	Positive(%)	$\chi^2$	P
Pathological types							
Well differentiated	35	21(60.0)			17(48.6)		
Moderately differentiated	14	12(85.7)	17.86	<0.01	10(71.4)	16.08	<0.01
Poorly differentiated	18	16(88.9)			14(77.8)		
Clinical classification							
T2	17	9(52.9)			7(41.2)		
T3	31	23(74.2)	12.46	<0.01	19(61.3)	11.02	<0.01
T4	19	17(89.5)			15(78.9)		
Lymph node metastasis							
N0*	48	29(60.4)			23(47.9)		
N1	19	17(89.5)	11.24	<0.05	16(84.2)	12.10	<0.01
Invasion of peripheral tissue							
No	17	4(23.5)			2(11.8)		
Ens	50	40(80.0)	19.75	<0.01	33(66.0)	19.91	<0.01
Inverted papilloma	48	10(20.8)	8.66	<0.01	13(27.1)	5.10	<0.05
Sinusitis and polyps	35	4(11.4)	28.28	<0.01	6(17.1)	14.98	<0.01

Note: Well differentiated adenocarcinoma compared with poorly differentiated adenocarcinoma  $\chi^2_{ODC} = 17.86, P < 0.01$ ;  $\chi^2_{GAD} = 16.08, P < 0.01$ . \*: No find metastasis of clinical, the pathological examination be confirmed after neck dissection

阳性细胞率均值为 36%~50%，预后差，生存时间短。三组患者术后生存率差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。

### 3 讨论

ODC 是多胺代谢的关键酶，广泛存在于人体和动物各组织细胞内，由两个分子量各为 50 KD 左右的亚基组成的二聚体。ODC 基因包括 ODC<sub>1</sub> 和 ODC<sub>2</sub>，各自定位于不同的染色体，ODC<sub>1</sub> 定位于 2P<sup>25</sup> 处，ODC<sub>2</sub> 位于 7q<sup>31</sup> 处。ODC<sub>1</sub> 普遍存在于生物体，是主要功能基因，而 ODC<sub>2</sub> 仅存在于人体，是伪基因，无明确功能。ODC 的降解主要靠体内产生的抗酶完成，抗酶并不抑制 ODC 合成，而是与 ODC 结合生成 ODC 抗酶复合物，促使 ODC 被 26S 蛋白酶体

降解，从而使多胺合成减少<sup>[1]</sup>。ODC 作为多胺合成过程中的第一个限速酶，多胺是鸟氨酸在 ODC 催化转化而来，已证实多胺对细胞增长、增殖、分裂、分化及恶性转化起极其重要作用，如果 ODC 过度表达，多胺水平相应升高则会引起细胞过度增殖或向恶性表型转化<sup>[1,11-12]</sup>。近年国外学者研究发现 ODC 表达水平与一些恶性肿瘤发生、进展、转移、侵袭潜力及预后有密切关系，且可作为一些消化系统恶性肿瘤癌前病变诊断有用的生物学指标；ODC 高水平表达的恶性肿瘤进展快、分化差、易发生转移、侵袭力和侵袭潜力强、临床分期高及预后差，且可能可作为药物作用的靶点或疗效指标，寻找对 ODC 有作用的药物对于治疗其相关疾病可能有重要临床意义<sup>[1-5,11-13]</sup>。现国内外还未发现 ODC 在鼻腔鼻窦腺

癌的相关报道。本组资料发现,鼻腔鼻窦腺癌 ODC 表达阳性率明显高于癌旁组织、鼻内翻性乳头状瘤和慢性鼻窦炎鼻息肉,ODC 表达阳性的鼻内翻性乳头状瘤和慢性鼻窦炎鼻息肉组织,黏膜存在化生且均有中或重度不典型增生。鼻腔鼻窦高分化腺癌、无淋巴结转移及未侵犯鼻腔鼻窦外周围组织器官病例(临床分型 T2N0M0)ODC 表达阳性率明显低于鼻腔鼻窦低分化腺癌、淋巴结转移及侵犯鼻腔鼻窦周围组织器官病例(临床分型 T3N0M0, T4N1M0)。其结果与国内外学者在其他恶性肿瘤报道的文献较一致,同时分析鼻腔鼻窦腺癌 T3 和 T4 期的病例 ODC 表达阳性率明显高于 T2 期的病例,这点与文献报道有出入。作者认为这与鼻腔鼻窦腺癌 T3 和 T4 期的患者肿瘤恶性程度较高、进展快有密切关系。这也更提示 ODC 表达水平与鼻腔鼻窦腺癌发生、进展密切相关,ODC 可作为评估鼻腔鼻窦腺癌预后的重要酶学指标,同时检测鼻腔鼻窦良性病变 ODC 表达水平对预防和早期发现鼻腔鼻窦腺癌可能有重要临床价值。

GAD65 为  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)合成的关键酶,而 GABA 源性系统在调节细胞生长发育等方面起重要作用,应用 GABA 受体拮抗剂处理后可抑制多种细胞包括恶性肿瘤细胞的生长发育<sup>[6-7]</sup>。近年研究发现一些恶性肿瘤组织中(如结肠癌、乳腺癌、胃癌等)GAD65 表达水平明显高于正常及良性病变组织,且与恶性肿瘤进展、生物学行为和预后有密切关系,GAD65 高水平表达者恶性程度高、进展快、易发生转移和侵袭潜力强<sup>[8-10,14]</sup>。本组资料淋巴结 GAD65 表达水平有淋巴结转移者明显高于无淋巴结转移者( $P < 0.01$ ),与国外文献报道极其相符。本组肿瘤资料发现,鼻腔鼻窦腺癌 GAD65 表达阳性率明显高于癌旁组织、鼻内翻性乳头状瘤和慢性鼻窦炎鼻息肉,GAD65 表达阳性的鼻内翻性乳头状瘤和慢性鼻窦炎鼻息肉组织,黏膜存在化生且均存在重度不典型增生;鼻窦高分化腺癌、未侵犯鼻腔鼻窦外周组织器官病例(临床分型 T2N0M0)GAD65 表达阳性率明显低于鼻腔鼻窦低分化腺癌,侵犯鼻腔鼻窦周围组织器官病例(临床分型 T3N0M0, T4N1M0)。这与国内外一些文献报道其他部位的肿瘤结果较一致,提示 GAD65 表达水平与鼻腔鼻窦腺癌发生、发展及预后可能有较密切关系,阳性表达水平高者可能进展快、恶性程度高、易发生转移及侵犯周围组织器官;且检测鼻腔鼻窦良性病变组织中 GAD65 表达水平对预防和早期发现鼻腔鼻窦癌可能有一定临床价值,特别是鼻内翻性乳头状瘤组

织中 GAD65 表达阳性,病变组织可能存在恶变。

ODC 和 GAD65 两种关键酶存在于恶性肿瘤细胞,两种关键酶表达阳性率高者,患者术后预后差。我们统计 ODC 和 GAD65 表达阳性率相对高,且在高倍视野阳性细胞率均值为 36%~50%,预后差,术后生存时间短。与 Love RR<sup>[4]</sup>提出的 ODC 在乳腺癌中预后因素和 Mazurkiewicz M<sup>[14]</sup>提出的 GAD 在乳腺肿瘤中作用明显相似。本组资料收集仍较少,仍需积累资料行更深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Gerner EW, Meyskens FL Jr. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(10): 781-792.
- [2] Miao XP, Li JS, Li HY, et al. Expression of ornithine decarboxylase in precancerous and cancerous gastric lesion[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(20):2867-2871.
- [3] Subhi AL, Tang B, Balsara BR, et al. Loss of methylthioadenosine phosphorylase and elevated ornithine decarboxylase is common in pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(21):7290-7296.
- [4] Love RR, Astrow SH, Cheeks AM, et al. Ornithine decarboxylase (ODC) as a prognostic factor in operable breast cancer[J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(2):223-229.
- [5] 宋旭,田辉,刘贤锡,等.鸟氨酸脱羧酶和 S-甲硫氨酸脱羧酶双反义 RNA 腺病毒抑制食管癌细胞的增殖和侵袭[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(4):316-320.
- [6] Matsuba T, Yano M, Abiru N, et al. Expression of recombinant human glutamic acid decarboxylase(GAD) in myeloma cell and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for autoantibodies to GAD[J]. *J Biochem*, 1997, 121(1):465-475.
- [7] Pinal CS, Cortes V, Tobin AJ. Multiple elements regulate GAD65 transcription[J]. *Dev Neurosci*, 1997, 19(6):465-475.
- [8] Matuszek M, Jesipowicz M, Kleinrok Z. GABA content and GAD activity in gastric cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2001, 7:377-381.
- [9] Opolski A, Mazurkiewicz M, Wietrzyk J, et al. The role of GABA-ergic system in human mammary gland pathology and in growth of transplantable murine mammary cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2000, 19(3):383-390.
- [10] Kleinrok Z, Matuszek M, Jesipowicz J, et al. GABA content and GAD activity in colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as S. C. tumors nu/nu mice[J]. *J Physiol pharmacol*, 1998, 49(2):303-310.
- [11] Manni A, Washington S, Griffith JW, et al. Influence of polyamines on in vitro and in vivo features of aggressive and metastatic behavior by human breast cancer[J]. *Cell Exp Metastasis*, 2002, 19(2):95-105.
- [12] Kubo S, Tamori A, Tanalia H, et al. Polyamine metabolism and recurrence after resection for hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatogastroenterology*, 2004, 51(55):208-221.
- [13] Wolf C, Bruss M, Hanish B, et al. Molecular basis for the antiproliferative effect of agmatine in tumor cells of colonic, hepatic, and neuronal origin[J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 71(1):276-283.
- [14] Mazurkiewicz M, Opolski A, Wietrzyk J, et al. GAD activity in human and mouse normal and neoplastic mammary gland[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 1999, 18(2):247-253.