

[文章编号] 1000-2200(2006)06-0569-03

· 基础医学 ·

# 神经胶质瘤组织中鸟氨酸脱羧酶的表达及其多胺含量检测的意义

王 春<sup>1</sup>, 武文娟<sup>2</sup>, 陈士文<sup>1</sup>, 赵 莉<sup>1</sup>

[摘要]目的: 探讨鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)的 mRNA 丰度及多胺含量的改变在神经胶质瘤发生中的作用。方法: RT-PCR 法检测神经胶质瘤组织中 ODC 的表达, 同时使用 HPLC 法检测瘤组织、正常神经组织中多胺的含量。结果: RT-PCR 结果证实神经胶质瘤组织中 ODC mRNA 丰度明显高于正常的神经组织; 瘤组织中精胺和精脒含量均高于正常神经组织 ( $P < 0.01$ ); 而腐胺的含量二者差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论: ODC 的高活性及由此产生高含量精胺与神经胶质瘤的发生有一定关系, ODC 可能作为神经胶质瘤的肿瘤标志物, 在诊断和判断其预后方面有一定的意义; 抑制神经组织中 ODC 的表达有可能作为生物治疗神经胶质瘤重要手段。

[关键词] 神经胶质瘤; 鸟氨酸脱羧酶; 多胺

[中国图书资料分类法分类号] R 739.264

[文献标识码] A

## Clinical significance of determination of ornithine decarboxylase and polyamine in human gliomas

WANG Chun<sup>1</sup>, WU Wenjuan<sup>2</sup>, CHEN Shiwen<sup>1</sup>, ZHAO Li<sup>1</sup>

(1. Department of Anatomy; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology; Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective** To explore the significance of determination of ornithine decarboxylase (ODC) messenger RNA and content of polyamine in human glioma. **Methods** RT-PCR was used to examine ODC mRNA expression in human glioma and high performance liquid chromatograph (HPLC) was used to determine the content of polyamine in tumor compared with control group. **Results** The expression level of ODC mRNA was increased in gliomas than normal nervous tissues and the content of spermine and spermidine in tumor tissues was higher than in normal tissues ( $P < 0.01$ ), but there was no difference of the content of putrescine between glioma and normal tissues ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** It was evidence that the high ODC activation and high content of spermine were closely correlated with the growth of glioma. ODC may represent a tumor marker and may play an important role in diagnosis and prognosis of glioma. It may be an important method for biological immunotherapy.

[Key words] polyamine; gliomas; ornithine decarboxylase

多胺是细胞增殖调控的重要物质, 生理性多胺包括腐胺 (putrescine, Pu)、精脒 (spermidine, Sd) 和精胺 (spermine, Sm), 在肿瘤组织中多胺的聚集对其生长有促进作用。鸟氨酸脱羧酶 (ornithine decarboxylase, ODC) 是多胺生物合成过程中的限速酶。肿瘤组织中 ODC 的含量均较正常组织有明显增高, 而且 ODC 的增高程度与肿瘤恶性程度呈正相

关<sup>[1]</sup>。ODC 基因表达增强、ODC 活性升高, 可导致多胺生物合成增加, 与肿瘤的发生、发展有密切关系<sup>[2,3]</sup>。神经胶质瘤是最常见的脑部恶性肿瘤, 约占颅内肿瘤的 40%。本研究旨在通过 RT-PCR 方法检测神经胶质瘤组织中 ODC 的表达, 同时对瘤组织和正常脑组织中多胺的含量进行检测, 探讨 ODC 的 mRNA 丰度及多胺含量的改变在神经胶质瘤的发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

1.1 标本采集 从蚌埠医学院附属医院肿瘤外科收集, 分为两组, 一组送病理科进行病理诊断, 另一

[收稿日期] 2006-01-17

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究计划项目 (2004kj288zc)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 解剖学教研室, 2. 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 王 春 (1968-), 男, 讲师。

- [3] 周丽萍, 周 洁, 包其郁, 等. 解脲支原体感染与早产及胎膜早破的关系[J]. 中华妇产科杂志, 1999, 34(5): 287-289.
- [4] 陈淑兰, 张 力. 沙眼衣原体和解脲支原体引起自然流产、不育的临床观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(2): 114-115.
- [5] 叶元康, 林特夫, 黄谷良. 溶脲支原体的分离及生物学特性[J]. 中华微生物免疫学, 1984, 4(4): 253-256.
- [6] Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, et al. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction[J]. *J Clin Microbiol*

1993, 31(5): 1358-1361.

- [7] Quinn PA, Shewchuk AB, Shuber J, et al. Serologic evidence of *ureaplasma urealyticum* infection in women with spontaneous pregnancy loss[J]. *Am J Obstet Gynecol* 1983, 145(2): 245-250.
- [8] Sanchez J, Regan J. Vertical transmission of *ureaplasma urealyticum* from mothers to preterm infants[J]. *Pediatr Infect Dis* 1990, 9(6): 398-401.
- [9] 徐 晨, 孙广芳, 朱云凤, 等. 溶脲支原体感染对大鼠生育及胚胎发育影响的研究[J]. 生殖与避孕, 1996, 16(2): 125-129.

组置 -70℃冻存备用。14例临床确诊的神经胶质瘤组织中心标本,其中男8例,女6例,年龄(42.5±11.3)岁。液氮中保存的新鲜正常神经组织标本5例,其中男3例,女2例,作对照。

1.2 试剂 M-MLV 逆转录酶试剂盒和 Trizol RNA 提取试剂购自 GIBCO 公司;通用引物 Oligo dT 和 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司(大连)。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 根据 Genbank (NM\_002539)提供的 ODC mRNA 序列,设计上游引物 P1: 5'ATG ATT CCA AAG CAG TCT GT 3',下游引物 P2: 5'ACA TAA AGG TCT GCT CAC TC 3'。扩增产物长度为 473 bp。同时以 GAPDH 作为内参基因(Genbank BC083511),其上游引物为 P3: 5'GTG GGC AAG GTC ATC CCT GAG 3',下游引物 P4: 5'TGA CAA GGTGCG GCT CCC TAG 3',PCR 产物大小为 572 bp。引物均由上海生工生物公司合成。从 -70℃冰箱取出冻存的肿瘤组织和正常的神经组织,称取 50~100 mg 的组织块,置干烤处理的匀浆器中,加入 1 ml 的 Trizol 试剂,冰上研磨组织块。按照 Trizol 试剂说明书提取组织中的总 RNA。以 Oligo dT 为通用引物,10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4 μl, 5× RT-buffer 4 μl, 10 mmol/L dNTP mixture 2 μl, 40 u μl RNase A 抑制剂 0.5 μl, 100 u μl AMV 2 μl 加 DEPC 水至总体积为 20 μl, 75℃变性 5 min, 42℃逆转录 1 h。以逆转录产物 1 μl 为模板,1 μmol/L P1-P2 和 1 μmol/L P3-P4 各 1 μl, 10× PCR buffer 2 μl, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 μl, 10 mmol/L dNTP mixture 0.5 μl, 10 u μl Taq 酶 0.5 μl 加双蒸水至 20 μl 混匀后 PCR 共扩增。扩增条件为 94℃预变性 5 min,按 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min 进行 35 个循环,最后 72℃延伸 10 min。电泳图谱用 UV Soft UV Band Application V97.04 软件分析。

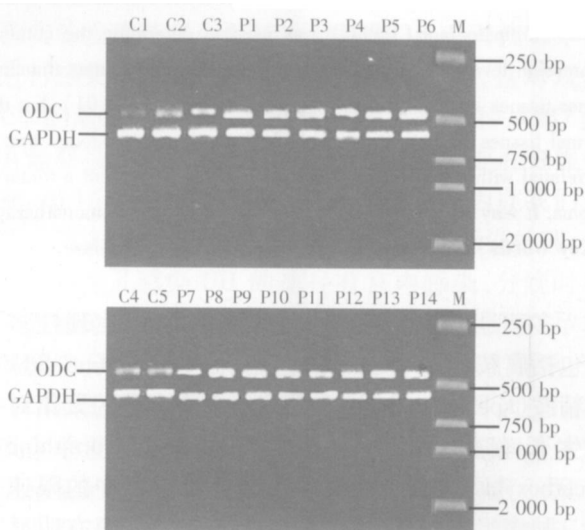
1.3.2 多胺的测定 (1)匀浆制备:取 -70℃保存的神经胶质瘤组织标本,生理盐水冲洗 2 遍,吸干表面水分并在 4℃剪碎,加预冷匀浆制备液(50 mmol/L PBS,内含 0.1 mmol/L 5-磷酸吡哆醛,5 mmol/L 二硫苏糖醇,1 mmol/L EDTA, pH 7.2),按 1/10(w/v)制成匀浆,25 000×g 4℃离心 20 min,取上清待测。

(2)多胺含量的测定:利用高效液相色谱法测定多胺含量(由军事医学科学院放射医学研究所协助完成)。固定相为 Nucleosil C-183 μ (100 mm × 4.6 mm) 色谱柱,流动相由甲醇和双蒸水组成,进样开始时甲醇体积比为 80%,进样后线性梯度增加甲醇比例,至 11 min 结束时增至 100%,停止分析后甲醇恢复至进样时比例。柱温 50℃,流速 1 ml/min 荧光检测波长激发波长 (Ex) 为 370 nm,发射波长 (Em) 为 506 nm。

1.4 统计学方法 采用 t(或 t') 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR 5 例对照组织标本 ODC mRNA 丰度较低,而 14 例神经胶质瘤组织 ODC mRNA 丰度明显增高(见图 1、2)。



C1-C5:对照组织标本 P1-P4:神经胶质瘤组织标本 M:DL2000 marker 图1 RT-PCR 共扩增 ODC 和 GAPDH

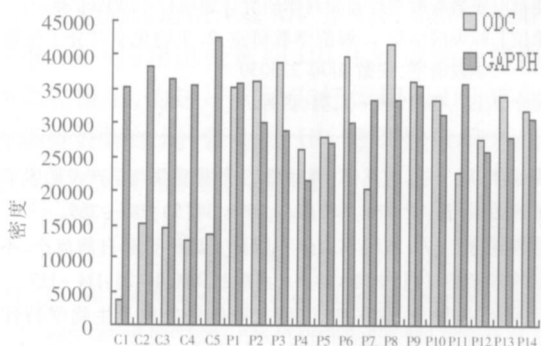


图2 RT-PCR 半定量分析

2.2 组织中多胺含量的检测 神经胶质瘤组织中

腐胺含量和正常神经组织差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 而精脒和精胺含量均高于正常神经组织 ( $P < 0.01$ ) (见表 1)。

表 1 神经胶质瘤组织及正常神经组织多胺含量比较 ( $\mu\text{mol/g} \bar{x} \pm s$ )

分组	n	Pu	Sm	Sd
正常组织	5	60.35 ± 20.53	95.11 ± 8.08	317.71 ± 25.16
肿瘤组织	14	75.08 ± 29.35	251.97 ± 27.25	462.55 ± 67.93
t	—	1.02	18.73 <sup>△</sup>	6.60 <sup>△</sup>
P	—	> 0.05	< 0.01	< 0.01

△示 t 值

### 3 讨论

鸟氨酸脱羧酶是多胺合成途径上第一个受到严格调控的酶, 在多种哺乳动物细胞分裂和分化过程中起着重要作用。其活性受雄激素的调节, 能催化鸟氨酸脱羧生成腐胺, 后者在精脒合成酶作用下由脱羧基的 S 腺苷甲硫氨酸提供丙胺基合成精脒, 精脒再由 5 腺苷 - 3 甲硫基丙胺提供丙胺基合成精胺。多胺 (包括腐胺、精脒和精胺) 均带有较多的正电荷, 可与细胞中的 DNA 及 RNA 结合, 稳定了它的结构, 促进细胞生长和分裂, 是细胞增殖调控的重要物质。大量研究证明, ODC mRNA 高表达与肿瘤的发生有密切的关系<sup>[4]</sup>, 细胞的增殖与 ODC mRNA 高表达有关, ODC 抑制会直接影响细胞的生长和转化<sup>[5]</sup>。ODC mRNA 高表达是恶性肿瘤发生时的早期事件, 是细胞分裂时从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期的过程中出现的标志性反应<sup>[6]</sup>。在本研究中, 证实神经胶质瘤组织中的 ODC mRNA 丰度显著高于正常组织。而且仅限于肿瘤内部, 而肿瘤周围不改变, 其增高程度与肿瘤恶性程度呈正相关。因此, ODC 可以作为神经胶质瘤的肿瘤标志物<sup>[7~9]</sup>, 在诊断和判断预后方面具有一定的意义。

多胺存在于所有真核细胞, 其合成与细胞的生长或肿瘤细胞的增殖密切相关, 在调控细胞的增殖与分化的过程中起关键作用。在肿瘤中, 多胺合成增多并可向周围组织扩散。而且神经胶质瘤组织中精胺和精脒的含量均高于正常组织 ( $P < 0.01$ )。神经组织中 ODC mRNA 增高以及由此产生较高浓度

的精胺和精脒, 在神经胶质瘤的发生中起了非常重要的作用。事实上, 由于 ODC 的过表达, 有可能是诱发脑胶质瘤的重要原因之一, 并且 ODC 长期过表达, 导致局部组织中精胺和精脒含量增加, 从而加速了细胞增殖; 多胺不仅能诱导 RNA 的转录, 而且能稳定 mRNA 和 rRNA, 从而提高转录和翻译效率<sup>[10]</sup>; 然而, 多胺对 ODC 基因的转录具有负反馈调节作用<sup>[11]</sup>, 因为 ODC 基因转录水平愈高, 酶活性也愈高, 催化生成的多胺越多, 当多胺的浓度超过一定域值就会对转录起抑制作用, 从而避免了多胺的积累对 mRNA 合成的过度刺激; 同时细胞内多胺水平的提高可加速 ODC 的降解<sup>[10]</sup>。在该研究中, 多胺中的腐胺在肿瘤组织和正常组织无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Ernestus RI, Rohn G, Hosmann KA, et al. Polyamine metabolism in experimental brain tumors of rat [ J ]. *J Neurochem*, 1993; 60 (2): 417 - 422
- [ 2 ] Auvinen M, Paasinen A, Andersson LG, et al. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation [ J ]. *Nature* 1992; 360(6402): 355 - 358.
- [ 3 ] Wallace HM, Fraser AV. Inhibitors of polyamine metabolism [ J ]. *Amino Acids* 2004; 26(4): 353 - 365
- [ 4 ] Giardiello FM, Casero RA Jr, Hamilton SR, et al. Prostanoids, ornithine decarboxylase and polyamines in primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis [ J ]. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 425 - 431.
- [ 5 ] Liu XX, Wang L, Lin YQ, et al. Ornithine decarboxylase activity and its gene expression are increased in benign hyperplastic prostate [ J ]. *Prostate* 2000; 43(1): 83 - 87.
- [ 6 ] Brooks WH. Polyamine involvement in the cell cycle, apoptosis and autoimmunity [ J ]. *Med Hypotheses* 1995; 44(5): 331 - 338.
- [ 7 ] Malatere J, Strambi G, Aouane A, et al. A novel role for polyamines in adult neurogenesis in rodent brain [ J ]. *Eur J Neurosci* 2004; 20(2): 317 - 330.
- [ 8 ] Schipper RG, Romijn JG, Cuijpers VM, et al. Polyamines and prostatic cancer [ J ]. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(2): 375 - 380
- [ 9 ] Crawford NR, Colliver DW, Gakandiuk S. Tumor markers and colorectal cancer: Utility in Metagenetics [ J ]. *J Surg Oncol* 2003; 84(4): 239 - 248
- [ 10 ] Minuk GY. Gaba and hepatocellular carcinoma [ J ]. *Molekular Cellular Biochemistry* 2000; 207(1-2): 105 - 108.
- [ 11 ] Hayashi S, Murakami Y. Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase [ J ]. *Biochem J* 1995; 306(1): 1 - 10