

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.05.012

# 自噬基因 Beclin1 在细针穿刺乳腺病变中的表达及其与 Bcl-2 和 p53 的相关性

杜芸,李迎娟,吴家宁,王珩

## Expression of Beclin1 in Fine Needle Aspiration Breast Lesions and Its Relationship with Bcl-2 and p53

DU Yun, LI Yingjuan, WU Jianing, WANG Heng

*Department of Cytopathology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China*

**Abstract: Objective** To explore the expression of Beclin1 in fine needle aspiration breast lesions, and its relationship with Bcl-2 and p53, to discuss the role of autophagy related gene-Beclin1 in breast cancer development. **Methods** RT-PCR and immunohistochemistry were used to detect the mRNA and protein expression of Beclin1, Bcl-2, p53 in breast lesions. **Results** The expression of Beclin1 mRNA in breast cancers was lower than those in benign breast lesions ( $P < 0.05$ ); the expressions of Bcl-2 and p53 mRNA in breast cancers were higher than those in benign breast lesions ( $P < 0.05$ ). The positive expression rate of Beclin1 in breast cancers was lower than that in benign breast lesions ( $P < 0.05$ ); the positive expression rates of Bcl-2 and p53 in breast cancers were higher than those in benign breast lesions ( $P < 0.05$ ); there were negative correlations between Beclin1 and p53, Bcl-2 ( $P < 0.05$ ); no correlation was found between p53 and Bcl-2 ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The low expression of Beclin1 and the high expression of p53, Bcl-2 is identified in breast cancers. There are negative correlations between Beclin1 and p53, Bcl-2 in breast cancers.

**Key words:** Breast cancer; Autophagy; Apoptosis; Beclin1; p53; Bcl-2

**摘要:目的** 检测细胞自噬基因 Beclin1 在细针穿刺乳腺良恶性病变中的表达及其与 Bcl-2、p53 的关系,探讨其在乳腺癌发生发展中的作用及其机制。**方法** 采用 RT-PCR 和免疫组织化学检测乳腺良恶性病变中 Beclin1、Bcl-2、p53 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** Beclin1 mRNA 在乳腺癌中的表达明显低于在乳腺良性病变中的表达 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2、p53 mRNA 在乳腺癌中的表达高于在乳腺良性病变中的表达 ( $P < 0.05$ )。Beclin1 蛋白在乳腺癌中的阳性表达率明显低于在乳腺良性病变中的阳性表达率 ( $P < 0.05$ ); Bcl-2、p53 蛋白在乳腺癌中的阳性表达率明显高于在乳腺良性病变中的阳性表达率 ( $P < 0.05$ ); 在乳腺癌中 Beclin1 蛋白表达与 Bcl-2 和 p53 蛋白表达之间存在负相关 ( $P < 0.05$ ); 而 Bcl-2 和 p53 蛋白的表达无相关性 ( $P > 0.05$ )。**结论** Beclin1 在乳腺癌组织中表达下调,而 Bcl-2、p53 在乳腺癌中均有高表达。Beclin1 蛋白与 Bcl-2、p53 蛋白在乳腺癌组织中的表达存在负相关。

**关键词:** 乳腺癌; 自噬; 凋亡; Beclin1; p53; Bcl-2

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A

## 0 引言

细胞自噬 (autophagy) 是不同于凋亡的 II 型程序化死亡,是将细胞内受损、变性或衰老的蛋白质以及细胞器运输到溶酶体进行消化降解的细胞自我消化过程,以双层膜结构包裹部分胞质和细胞器的自

噬体为特征<sup>[1]</sup>。近年来自噬与肿瘤发生、发展及治疗的关系越来越受到人们的关注。目前认为自噬对于肿瘤细胞存在双向效应,与肿瘤发展不同阶段、不同组织类型、细胞分化状态、周围环境等多种因素有关<sup>[2]</sup>。Beclin1 是新的候选抑癌基因,亦是哺乳动物调节自噬的关键基因,其通过调节自噬活性参与肿瘤的发生发展<sup>[3]</sup>。但其作用机制及其与凋亡的关系尚不十分清楚。本研究通过检测细针穿刺乳腺增生性病变和乳腺癌中 Beclin1 mRNA 和蛋白的表达及其与 Bcl-2 和 p53 的相关性,探讨自噬基因 Beclin1

收稿日期:2012-06-15;修回日期:2012-09-10

作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四医院癌检中心(细胞学室)

作者简介:杜芸(1967-),女,博士,主任医师,主要从事肿瘤病理学研究

在乳腺癌发生发展中所起的作用及其机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

1.1.1 PCR 标本来源及处理 收集河北医科大学第四医院癌检中心 2011 年 3 月 - 2012 年 1 月行乳腺细针穿刺的患者 63 例,均为女性,均未接受放疗、化疗和内分泌治疗。所有标本均留取两张细胞学涂片用于常规诊断,余下标本立即放入盛有无液氮 RNA 保存液的 EP 管(DEPC 水浸泡及高压灭菌处理后)中, - 20℃ 冷冻保存备用。所有针吸诊断均与组织学诊断相对照,以组织学诊断为标准。其中经组织病理确诊为乳腺癌患者 43 例,平均年龄为 52 岁(32~71 岁)。乳腺良性病变 20 例(包括乳腺腺病 9 例,纤维腺瘤 4 例,腺病伴腺瘤样增生 7 例),平均年龄为 43 岁(26~57 岁)。

1.1.2 免疫组织化学标本来源及处理 收集河北医科大学第四医院癌检中心 2011 年 10 月 - 2012 年 1 月行乳腺细针穿刺的患者 50 例,均为女性,未接受放疗、化疗和内分泌治疗。所有标本均匀涂抹于两张常规细胞学玻片和三张免疫组织化学细胞玻片。常规涂片经 95% 酒精固定 10 min 后常规 HE 染色,免疫组织化学涂片经 95% 酒精固定 10 min 后晾干,免疫组织化学备用。所有针吸诊断均与组织学诊断相对照,以组织学诊断为标准。其中经组织病理确诊为乳腺癌的患者 30 例,平均年龄为 51 岁(33~75 岁)。乳腺良性病变 20 例(包括乳腺腺病 10 例,纤维腺瘤 6 例,腺病伴腺瘤样增生 4 例),平均年龄为 45 岁(25~54 岁)。

1.1.3 主要试剂 RT-PCR 主要试剂 Trizol (SBS Corporation, 美国); M-MLV 反转录试剂盒 (Promega, 美国); DNA Marker (上海捷瑞生物工程有限公司); PCR 扩增试剂盒 (Promega, 美国); RNAsfixer 无液氮型样品 RNA 保存液 (上海捷瑞生物工程有限公司); 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成并纯化, Beclin1: 上游引物 5'-AAGA-CAGAGCGATGGTAG-3', 下游引物 5'-CTGGGCTGTGGTAAGTAA-3', 扩增片段长度 282 bp; p53: 上游引物 5'-CAGTCTACCTCCCGC-CATAA-3', 下游引物 5'-CCACAACAAAACAC-CAGTGC-3', 扩增片段长度 246 bp; Bcl-2 上游引物 5'-CCCTCCAGATAGCTCATT-3', 下游引物 5'-CTAGACAGACAAGGAAAG-3', 扩增片段长度

448 bp。免疫组织化学主要试剂: 兔抗人 Beclin1 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 鼠抗人 p53 蛋白单克隆抗体及鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 RT-PCR 检测 mRNA 的表达 采用 Trizol 一步法提取组织总 RNA, 实验步骤严格按试剂说明书进行, 于 2% 琼脂糖凝胶电泳上行总 RNA 完整性检测后, 反转录合成 cDNA。按 25  $\mu$ l 反应体系行 PCR 扩增, 反应条件为 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 1 min, 退火 45 s (退火温度 Beclin1: 56.9℃; p53: 56.4℃; Bcl-2: 52.6℃), 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min 结束反应。取 5  $\mu$ l PCR 产物加入 2% 琼脂糖凝胶中, 以 120 v/cm 电压电泳 30 min, 电泳结果在紫外线下采像, 并应用凝胶电泳成像分析系统分析, 测定其灰度值, 以内参照 GAPDH 的 OD 值标化目的基因的 OD 值, 得到相对含量进行分析。用下列公式表示: mRNA 的相对表达量 = 目的基因 OD 值 / GAPDH 的 OD 值。

1.2.2 免疫组织化学染色结果判定 采用 SP 法, 操作步骤按试剂说明书进行。以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 以乳腺癌组织阳性片作为阳性对照。Beclin1 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达在细胞质, p53 蛋白表达在细胞核, 阳性信号为胞质或胞核内出现棕黄色颗粒。根据染色强度和阳性细胞数综合分析, 染色为黄色至棕黄色及阳性细胞数  $\geq 15\%$  为阳性 (+)。几乎未见阳性细胞或阳性细胞  $< 15\%$  为阴性 (-)<sup>[4]</sup>。

### 1.3 统计学方法

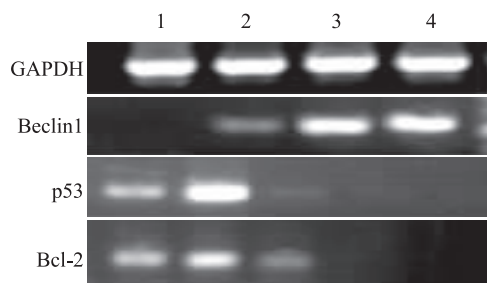
实验结果用 SPSS 13.0 软件进行分析, 对 3 个基因的 mRNA 表达结果进行 *t* 检验, 蛋白表达结果行卡方 ( $\chi^2$ ) 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 检测结果

对半定量 RT-PCR 的电泳结果进行分析, 见图 1、表 1, Beclin1 mRNA 在乳腺癌中的表达 ( $0.54 \pm 0.16$ ) 低于在乳腺良性病变中的表达 ( $0.78 \pm 0.15$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。p53 mRNA 在乳腺癌中的表达 ( $0.67 \pm 0.15$ ) 高于在乳腺良性病变中的表达 ( $0.47 \pm 0.15$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Bcl-2 mRNA 在乳腺癌中的表达 ( $0.65 \pm 0.19$ ) 高于在乳腺良性病变中的表达 ( $0.46 \pm 0.16$ ), 差异有统

计学意义( $P < 0.05$ )。



1,2:breast cancer;3,4:benign breast proliferative lesions  
图 1 RT-PCR 法检测 Beclin1、p53、Bcl-2 mRNA 在乳腺癌及良性病变中的表达

Figure 1 The expression of Beclin1, p53, Bcl-2 mRNA in breast cancer and benign breast proliferative lesions detected by RT-PCR method

表 1 乳腺良恶性病变中 p53、Bcl-2、Beclin1 mRNA 的表达  
Table 1 The mRNA expressions of p53, Bcl-2 and Beclin1 gene in breast benign and malignant lesions

Groups	n	p53	Bcl-2	Beclin1
Breast cancer	43	0.67 ± 0.15	0.65 ± 0.19	0.54 ± 0.16
Breast benign lesion	20	0.47 ± 0.15	0.46 ± 0.16	0.78 ± 0.15
t		-4.282	3.941	-5.595
P		0.000	0.000	0.000

## 2.2 免疫组织化学结果

2.2.1 Beclin1、p53、Bcl-2 在乳腺良恶性病变中的表达  
Beclin1 蛋白表达:30 例乳腺癌标本阳性表达率为 30%;20 例乳腺良性病变阳性表达率为 80%,两组之间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。p53 蛋白表达:30 例乳腺癌标本阳性表达率为 60%;20 例乳腺良性病变阳性表达率为 20%,两组之间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Bcl-2 蛋白表达:30 例乳腺癌标本阳性表达率为 73.3%;20 例乳腺良性病变阳性表达率为 30%,两组之间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2A~2D、表 2。

表 2 乳腺良恶性病变中 P53、Bcl-2、Beclin1 蛋白的表达

Table 2 The protein expressions of p53, Bcl-2 and Beclin1 in breast benign and malignant lesions

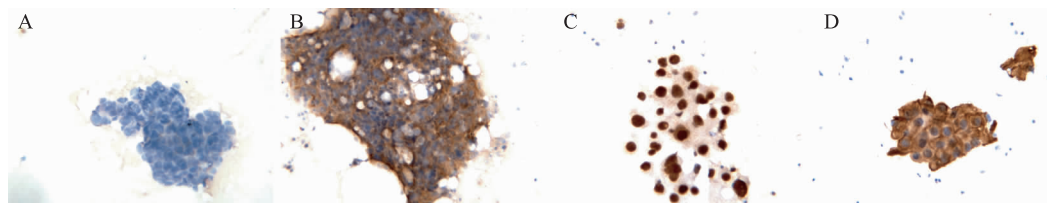
Groups	n	p53(+)		Bcl-2(+)		Beclin1(+)	
		n	%	n	%	n	%
Breast cancer	30	18	60.0	22	73.3	9	30.0
Breast benign lesion	20	4	20.0	6	30.0	16	80.0
$\chi^2$		7.792		9.145		12.000	
P		0.005		0.002		0.001	

2.2.2 Beclin1、p53、Bcl-2 蛋白在乳腺癌中表达的相关性  
Beclin1 与 p53、Bcl-2 蛋白在乳腺癌中的表达存在负相关性( $P < 0.05$ )。p53 与 Bcl-2 蛋白在乳腺癌中的表达无相关性( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

细胞死亡形式有凋亡(I型程序性死亡)、自噬和坏死(necrosis)3种类型,其中自噬广泛存在于真核细胞中,是不同于凋亡和坏死的另外一条细胞内容物的降解途径——II型程序性死亡途径<sup>[1]</sup>。自噬包括3个阶段<sup>[2]</sup>:(1)来自粗面内质网、高尔基体等的双层膜呈杯状包绕需降解的内源性物质及部分细胞质。(2)杯状双层膜结构延伸完全包裹降解成分形成自噬小体(autophagosome)。(3)自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,通过溶酶体酶发挥降解作用,而自噬体膜脱落,其中的自噬蛋白可循环再利用。自噬既可以清除胞质内受损的细胞器、代谢产物以及胞内感染微生物等,以实现细胞代谢、细胞器更新和胞内防御的需要,同时它又可作为一种细胞死亡程序诱导细胞自主性死亡<sup>[5]</sup>。

目前认为自噬在肿瘤发生发展中起促进和抑制双重作用<sup>[2,6]</sup>。癌基因的激活或上调,抑癌基因的缺失、突变或失活等均对自噬有负调节作用,这说明生理状态下自噬可能抑制肿瘤发生,而且上调自噬可能是预防肿瘤的一种新方法;另一方面,在肿瘤发



A: the negative expression of Beclin1 in breast cancer; B: the positive expression of Beclin1 in benign breast lesions; C: The positive expression of p53 in breast cancer; D: the positive expression of Bcl-2 in breast cancer

图 2 Beclin1、p53 和 Bcl-2 在不同乳腺组织中的表达(SP × 200)

Figure 2 The expression of Beclin1, p53 and Bcl-2 in different breast tissue(SP × 200)

展过程中,自噬使肿瘤细胞适应不利的代谢状况或产生药物抗性则有利于肿瘤的进展。Beclin1 基因是哺乳动物参与自噬的特异性基因。大量研究表明 Beclin1 不仅参与自噬体的形成,还可通过调节自噬活性对肿瘤发生、发展起着重要作用<sup>[7]</sup>。

研究表明在哺乳动物细胞中自噬和凋亡在一些情况下可能相互联系,并可能有着共同的调节机制。自噬可保护细胞免于发生凋亡和坏死;另一方面自噬又可以向凋亡转化,共同促进细胞死亡。抗凋亡蛋白 Bcl 2 是主要的癌蛋白,除介导细胞死亡外,还对细胞代谢、自噬等有明显的调控作用<sup>[8]</sup>。

p53 基因作为一种转录因子,能促进或抑制很多与细胞周期及凋亡相关基因的表达,在应激时 p53 也能调控自噬<sup>[9-10]</sup>,其具体机制有待于进一步研究。

本研究显示:Beclin1 在乳腺癌组织中表达下调,p53、Bcl-2 在乳腺癌中均有高表达,说明细胞自噬和凋亡均参与了乳腺癌的发生发展;Beclin1 蛋白与 p53 和 Bcl-2 蛋白在乳腺癌组织中的表达存在负相关关系,说明 p53 和 Bcl-2 可能参与细胞自噬的调控,自噬和凋亡可能存在某些共同调控途径,共同影响乳腺癌的发生。

#### 参考文献:

- [1] Wang LX. Autophagy, senescence and tumour immunity[J]. Shi Yong Lao Nian Yi Xue, 2010, 24(3):184-9. [王立新. 自噬、衰老与肿瘤免疫[J]. 实用老年医学, 2010, 24(3):184-9.]
- [2] Brech A, Ahlquist T, Lothe RA, *et al.* Autophagy in tumour suppression and promotion[J]. Mol Oncol, 2009, 3(4):366-75.
- [3] Huang X, Bai HM, Chen L, *et al.* Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors[J]. J Clin Neurosci, 2010, 17(12):1515-9.
- [4] Fang SZ, Wang GH, Cao NS. Detection and significance of sex hormone receptors by fine needle aspiration cytology in breast carcinomas[J]. Lin Chuang Wai Ke Za Zhi, 2007, 15(6):387-8. [方淑珍, 王桂华, 曹宁殊. 乳腺癌针吸细胞学激素受体的测定及临床意义研究[J]. 临床外科杂志, 2007, 15(6):387-8.]
- [5] Tsuchihara K, Fujii S, Esumi H. Autophagy and cancer: Dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues[J]. Cancer Lett, 2009, 278(2):130-8.
- [6] Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, *et al.* Anti- and pro-tumor functions of autophagy[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1793(9):1524-32.
- [7] Liang QQ, Feng ZB. State of the field in autophagy gene Beclin1[J]. Dang Dai Yi Xue, 2010, 16(9):21-2. [梁巧青, 冯震博. 自噬基因 Beclin1 的研究现状[J]. 当代医学, 2010, 16(9):21-2.]
- [8] Zheng HY, Wang XF, Sun BC. The molecular mechanisms of correlation between autophagy and apoptosis[J]. Yi Xue Zong Shu, 2011, 17(1):22-4. [郑海燕, 王兴芬, 孙保存. 自噬与凋亡相互关系的分子机制探讨[J]. 医学综述, 2011, 17(1):22-4.]
- [9] Ryan KM. p53 and autophagy in cancer: Guardian of the genome meets guardian of the proteome[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(1):44-50.
- [10] Zhao JX, Zhang Q, Li YH. Tumor suppressor gene p53 and autophagy[J]. Xian Dai Zhong Liu Yi Xue, 2011, 19(9):1896-9. [赵金香, 张强, 李耀华. 肿瘤抑制基因 p53 与自噬[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(9):1896-9.]

[编辑:刘红武;校对:杨 卉]