

Beclin1 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

刘全, 王建军, 潘永成, 孟利峰, 詹曦, 郑庆丰

Expression of Beclin1 in Non-small Cell Lung Cancer and Its Clinical Significance

LIU Quan, WANG Jianjun, PAN Yongcheng, MENG Lirong, ZHAN Xi, ZHENG Qingfeng

Department of Chest Surgery, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Corresponding Author: WANG Jianjun, Email: jianjunwang@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the expression of autophagy related Beclin1 gene in human nonsmall-cell lung cancer tissues. **Methods** Protein expression of Beclin1 was determined by immunofluorescence staining and Western Blot, mRNA expression were analyzed by RT-PCR. **Results** Immunofluorescence staining revealed that the levels of Beclin1 expression in lung cancer were significantly lower than those in adjacent noncancerous tissues and normal tissues, the expression rate was 8.3% ($P=0.000$). The Beclin1 mRNA expression in lung cancer, adjacent noncancerous tissues, normal tissues were 1.302 ± 0.074 , 1.691 ± 0.100 , 1.673 ± 0.081 ($F=6.6$, $P=0.002$). Beclin1 protein expression in lung cancer, around cancer tissues, normal tissues were 3.489 ± 0.293 , 5.306 ± 0.459 , 6.329 ± 0.580 ($F=9.73$, $P<0.01$). There was no dependability among the Beclin1 expression and pathology or clinic stage of lung cancer. **Conclusion** The protein and mRNA expression of Beclin1 in lung cancer were much lower than in adjacent noncancerous tissues and normal tissues, those differences were statistical significance, but in adjacent noncancerous tissues and normal tissues, the expression were proximal.

Key words: Autophagy; Beclin1; Nonsmall-cell lung cancer

摘要:目的 检测人非小细胞肺癌标本中自噬相关基因 Beclin1 的表达并讨论其意义及与细胞病理类型和临床分期的关系。方法 采用免疫荧光染色、RT-PCR 和 Western blot 法检测 54 例非小细胞肺癌的肺癌组织、癌旁组织、正常肺组织 Beclin1 蛋白、mRNA 表达。结果 免疫荧光染色显示 Beclin1 在肺癌组织中表达较低,表达率为 8.3%,显著低于癌旁和正常组织 ($P=0.00$)。Beclin1 mRNA 在肺癌、癌旁及正常组织中的相对表达量为 1.302 ± 0.074 、 1.691 ± 0.100 、 1.673 ± 0.081 ($F=6.6$, $P=0.002$), Western blot 检测 Beclin1 蛋白在肺癌、癌旁、正常组织中的相对表达量分别为 3.489 ± 0.293 、 5.306 ± 0.459 、 6.329 ± 0.580 ($F=9.73$, $P<0.01$)。Beclin1 蛋白和 mRNA 表达与肺癌病理组织类型和临床分期无明显关系。结论 Beclin1 蛋白和 mRNA 表达在肺癌组织中明显低于癌旁和正常组织,表达量的差异有统计学意义,在癌旁和正常肺组织中表达接近。

关键词: 自噬; Beclin1; 非小细胞肺癌

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)03-0184-04

0 引言

肺癌是发病率较高的恶性肿瘤,在其发生和发展过程中,抑癌基因的失活、细胞内异常物质和内环境的改变、受损细胞器清除障碍、癌细胞凋亡受阻等因素都可能起到重要作用,这些过程都有自噬参与。Beclin1 是一种与自噬密切相关的抑癌基因,编码自噬相关蛋白。Beclin1 在乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌

中表达均有缺失^[1],在蛋白和 mRNA 表达水平研究自噬在肺癌中的表达目前鲜见报道。本研究检验了自噬相关基因 Beclin1 在肺癌、癌旁组织、正常肺组织临床标本中的表达情况,并探讨其与肺癌的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象和标本采集

选择 2006 年 4 月~2006 年 10 月手术切除的非小细胞肺癌标本 54 例,所有病例经病理学确诊,术前均未接受放、化疗。每例标本取肺癌组织及相应的近癌旁组织(距肿瘤边缘 1~3 cm)、正常组织(距肿瘤边缘 > 5 cm)各一个样本。54 例患者中男 39 例,女 15 例。年龄 37~75 岁,平均(56.3 ± 8.1)岁。肿瘤组织病理类型均为非小细胞肺癌,其中:腺癌 32 例,鳞癌

收稿日期:2007-05-18;修回日期:2007-09-06

基金项目:湖北省科技攻关资助项目(2007AA301B32-2)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学附属协和医院胸外科

通讯作者:王建军, E-mail: jianjunwang@yahoo.com.cn

作者简介:刘全(1973-)男,博士在读,主治医师,主要从事自噬方面的研究

17 例,大细胞癌 3 例,腺鳞癌 2 例。依据 1997 年 UICC TNM 分期: 期 11 例, 期 27 例, a 期 16 例。所取组织标本手术切除后立即用生理盐水洗净血污后装 EP 管置液氮罐保存备用。

1.2 主要试剂

Beclin1 一抗购于美国 santa cruse 公司,逆转录 PCR 试剂盒(TakaRa 公司)和 RNA 试剂盒(包括了 Taq 酶)购置北京赛百盛基因技术有限公司, Beclin1 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.3 免疫荧光染色

取各组肺癌组织,冰冻切片(厚度0.1 mm),1/2 丙酮 + 1/2 酒精固定 5 min,0.3% Triton 破膜,加入 Beclin1 一抗 4 过夜(1 200),以 PBS 代替一抗作为空白对照,阴性抗体作为阴性对照。PBS 漂洗后加兔抗羊 IgG FICT 荧光二抗(1 100),避光 37 0.5 h。激光共聚焦显微镜下波长为353.6 nm 观察拍照。

1.4 RT-PCR 方法

RT-PCR 方法:每份冻存标本取 1 mm³ 剪碎研磨,加入 1 ml Trizol 溶液裂解,按 Trizol 试剂盒说明书采用一步法提取总 RNA,以 DNA/RNA 测定仪测定 RNA 的纯度和浓度。按逆转录合成试剂盒说明合成 cDNA,待用。GAPDH 作为内参照,目的片段为 452 bp,引物序列:5-ACCACAGTCCATGC-CATCAC-3 (上游), 5-TCCACCACCCTGTTGCTG-TA-3 (下游)。Beclin 1: 5-ATCCTGGACCGTGT-CACCATCCAGG-3 (上游), 5-GTTGAGCTGAGT-GTCCAGCTGG3 (下游), 363 bp; MAP-LC3: 5-GAA GATGTCCGACTTATTCGAGAG-3 (上游) 5-ACTCTCATACACCTCTGAGATTGG-3 (下游), 352 bp。PCR 条件:94 1 min, 55 1.5 min, 72

0.5 min,共 30 个循环。结果用 Quanlityone 分析,以阳性条带与 GAPDH 光密度比值作为阳性条带的相对表达值,SPSS 11.5 统计学分析。

1.5 Western blot 检测

RIPA buffer 200 μl 裂解细胞,考马斯亮蓝法蛋白定量,常规电泳、转印和封闭后,加入 Beclin1 (1 100)4 孵育过夜;抗人碱性磷酸酶标记二抗(1 3 000,北京中杉金桥生物技术有限公司),室温孵育 2 h,碱性磷酸酶染色 5 min,胶片曝光显影,结果用 Quanlityone 分析,-actin 为内对照,以阳性条带与内对照光密度比值作为阳性条带的相对表达值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS11.5 作统计学分析。

2 结果

2.1 免疫荧光结果

免疫荧光染色显示正常组织和癌旁组织均有 Beclin1 表达(表达率 100%),见图 1a~c,Beclin1 在 49 例肺癌标本中不表达(90.7%)。不表达的癌细胞呈空泡状未染色状态,见图 1d~f。Beclin1 在肺癌和非癌组织中的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 60.9, P = 0.00$)。

2.2 RTPCR 检测结果

Beclin1 mRNA 表达出现在所有组织中。GAPDH mRNA 半定量后 Beclin1 mRNA 在肺癌、癌旁、正常组织的相对表达量分别为 1.302 ± 0.074、1.691 ± 0.100、1.673 ± 0.081 ($F = 6.6, P = 0.002$)。Beclin1 在肺癌组织和其他组织中表达量差异有统计学意义,在癌旁组织和正常组织中的相对表达量差异无统计学意义,Beclin1 mRNA 在癌旁组织和正常组织中的表达量均强于肺癌组织,见图 2。

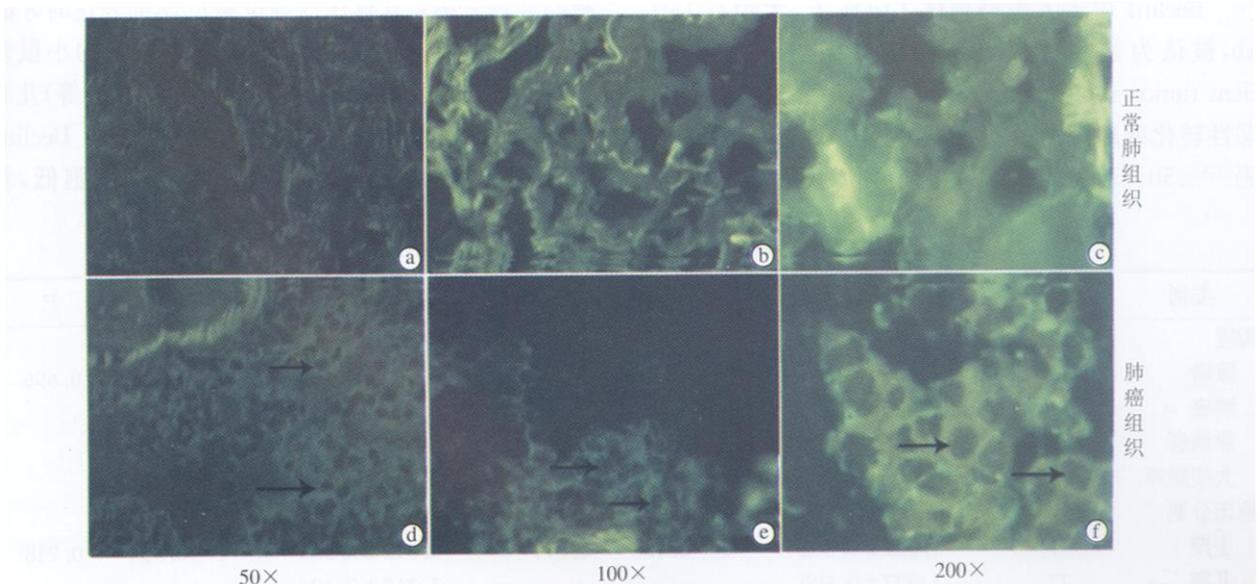


图 1 Beclin1 在肺癌组织未表达(箭头所示)呈空泡状,正常组织表达良好

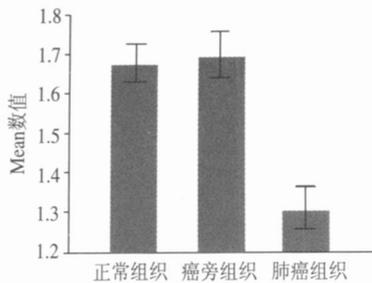


图2 Beclin1 mRNA在正常组织、癌旁组织、肺癌组织的表达

2.3 Western blot 检测结果

肺癌组织中的 Beclin1 蛋白低表达 (肺癌组织: 3.489 ± 1.760 ; 癌旁组织: 5.306 ± 2.755 ; 正常组织: 6.329 ± 3.483), 癌旁或正常组织中高表达 ($F = 9.73, P < 0.001$), 相对表达量差异有统计学意义 ($P = 0.000$) (图 3)。

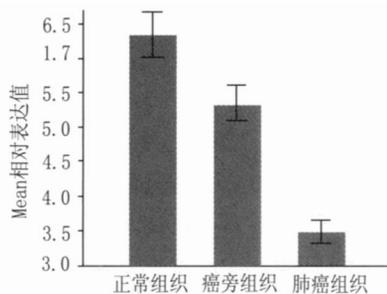


图3 Beclin1 蛋白在正常组织、癌旁组织、肺癌组织的表达

2.4 Beclin1 在不同病理类型和临床分期中表达

在本研究中, NSCLC 的不同细胞病理类型以及临床分期之间, Beclin1 的 mRNA 表达以及蛋白表达差异无统计学意义, 见表 1。

3 讨论

Beclin1 位于人类染色体 17q21 上, 大约有 150 kb, 被认为是一种双等位抑癌基因 (haploinsufficient tumor suppressor), 其杂合性缺失是细胞发生恶性转化的原因之一^[2]。据报道 75% 的人类卵巢癌^[3,4]、50% 乳腺癌^[5]和 40% 前列腺癌^[6]细胞存在

Beclin1 单等位基因缺失突变, 其表达量不同程度下降^[7]。恶性肿瘤中 Beclin1 的双等位基因突变则较为罕见。关于肺癌的 Beclin1 基因突变少见报道。本研究发现 Beclin1 蛋白在正常肺组织中表达的相对量显著高于肺癌样本, 和癌旁组织差异无统计学意义; 肺癌组织的免疫组化染色普遍呈阴性, 照片显示和正常组织形成鲜明对比的空泡状无染色区; RTPCR 结果也提示肺癌组织 Beclin1 基因转录的减少。同时我们也观察到, Beclin1 的表达情况与肺癌的病理组织类型和临床分期没有明显的相关性, 尚难对其与癌细胞生物学特性的关联作出推断。

Beclin1 是哺乳动物参与自噬的特异性基因, 主要通过调节自噬水平而对肿瘤的发生、发展起着重要作用^[2]。自噬现象是一种高度保守的细胞行为, 几乎存在于所有的物种, 构成了从简单的单细胞生物、植物到哺乳动物细胞中广泛存在着的降解/再循环系统的重要组成部分^[7], 并且是完整细胞器和大分子蛋白降解的主要途径^[8]。自噬的失调和肿瘤的发生、发展、转归关系密切^[9,10]。Beclin1 通过调节自噬水平参与细胞内大分子物质的循环及再利用、受损细胞器的清除, 并维护细胞内环境稳态^[11], 自噬体的形成与 ATG (Autophagy-related gene) 系列基因有关, Beclin1 是酵母 ATG6 的同系物, 也是哺乳动物参与自噬的特异性基因, Beclin1 基因主要与 III 型 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 形成复合体来调节其他的 ATG 蛋白在自噬前体结构中定位, 来调节自噬活性^[12]。已经证实上调 Beclin1 在哺乳动物细胞中的表达能够刺激自噬的发生^[13]。

和传统的抑癌基因不同, Beclin1 基因是一类新的抑癌基因, 只有在双等位染色体都表达时才能够发挥抑癌作用。Beclin1 等位基因敲除的小鼠发生自发性恶性变 (包括乳腺肿瘤、肺癌、肝癌等) 几率增加, 且易受 HBV 诱导的前恶性性损伤。Beclin1 蛋白在人类乳腺癌中表达较正常乳腺细胞低, 将

表1 不同病理类型和临床分期肺癌组织的 Beclin1 mRNA 和蛋白表达

类别	例数	mRNA (相对量)	<i>P</i>	蛋白 (相对量)	<i>P</i>
病理					
腺癌	32	1.421 ± 0.461	$t = 1.28$	3.404 ± 0.431	$t = 0.395$
鳞癌	17	1.220 ± 0.333		3.672 ± 0.425	
腺鳞癌	2				
大细胞癌	3				
临床分期					
期	11	1.329 ± 0.362	$F = 0.138$	3.312 ± 0.303	$F = 0.334$
期	27	1.327 ± 0.500	0.871	3.318 ± 0.494	0.718
a 期	16	1.241 ± 0.433		1.611 ± 0.293	

Beclin1 转染人乳腺癌细胞株 MCF7 后抑制 MCF7 细胞在体外增殖,并降低 MCF7 细胞的成瘤性^[13], 这些发现都提示了 Beclin1 的抑制肿瘤作用。Beclin1 基因还和一些肿瘤相关信号传导通道关系密切,例如: PTEN 通道^[14]和 Rb 信号传导通道^[15,16]都与 Beclin1 不同程度相关。Beclin1 也能够协同其他药物的抗肿瘤作用,上调 Beclin1 的表达能够增强顺铂诱导的胃癌细胞系 MKN28 凋亡,抑制 Beclin1 则削弱了顺铂的细胞毒作用^[17]。

关于 Beclin1 对于肺癌的早期诊断和预防的价值,调控 Beclin1 的表达对于不同时期肺癌细胞发展的影响,以及协同其它抗肿瘤手段对于肺癌的治疗效果,目前仍然缺少相关资料。进一步的研究将对阐明肺癌的发生、发展机制并为最终开发新的治疗手段提供理论依据。

参考文献:

- [1] Aita VM, Liang XH, Murty VV, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21 [J]. *Genomics*, 1999, 59(1) :59-65.
- [2] Yue Z, Jin S, Yang C, et al. Beclin1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25) : 15077-15082.
- [3] Tangir J, Muto MG, Bercowitz RS, et al. A 400 kb novel deletion unit centromeric to the BRCA1 gene in sporadic epithelial ovarian cancer [J]. *Oncogene*, 1996, 12(4) :735-740.
- [4] Futreal PA, Marks JR, Marks JR, et al. Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms [J]. *Cancer Res*, 1992, 52(9) :2624-2627.
- [5] H Saito, J Inazawa, S Saito, et al. Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(14) :3382-3385.
- [6] Gao X, Zacharek A, Salkowski A, et al. Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(19) :1002-1005.
- [7] Cuervo AM, Dice JF, Knecht E, et al. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes [J]. *Science*, 1996, 273(26) :501-503.
- [8] Takahiro Shintani, Daniel J. Klionsky. Autophagy in Health and Disease: A Double Edged Sword [J]. *Science*, 2004, 306(5) :990-995.
- [9] Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, et al. Dissection of autophagosome formation using App5-deficient mouse embryonic stem cells [J]. *J Cell Biol*, 2001, 152(4) : 657-668.
- [10] Toth S, Nagy K, Palfia Z, et al. Cellular autophagic capacity changes during azaserine-induced tumour progression in the rat pancreas. Up regulation in all premalignant stages and down-regulation with loss of cycloheximide sensitivity of segregation along with malignant transformation [J]. *Cell Tissue Res*, 2002, 309(3) : 409-416.
- [11] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation [J]. *Science*, 2000, 290(1) :1717-1721.
- [12] Edinger A L, Thompson C B. Defective autophagy leads to cancer [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(6) :422-424.
- [13] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by Beclin1 [J]. *Nature*, 1999, 402(6) :672-676.
- [14] Arico S, Petiot A, Bauvy C, et al. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(38) : 35243-35246.
- [15] Weinmann A S, Bartley S M, Zhang T, et al. Use of Chromatin Immunoprecipitation To Clone Novel E2F Target Promoters [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(20) : 6820-6832.
- [16] Nevins JR. The Rb/ E2F pathway and cancer [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(7) : 699-703.
- [17] Furuya D, Tsuji N, Yagihashi A, et al. Beclin 1 augmented cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 307(1) :26-40.

[编辑:贺文;校对:杨卉]