

Beclin1 与凋亡相关蛋白在口腔鳞癌中的表达及意义

孙维克 王培源 刘伟 王霞*

(滨州医学院 山东烟台 264003)

[摘要] 目的:探讨 Beclin1 及凋亡相关蛋白 bcl-2、survivin 及 bax 在口腔鳞癌中的表达及临床意义。方法:采用免疫组化 SP 法检测口腔黏膜癌变组织中(包括鳞癌 60 例,异常增生 48 例,癌旁正常口腔黏膜 60 例)Beclin1、bcl-2、survivin 及 bax 的表达,分析其相关性及临床意义。结果:Beclin1 在鳞癌和正常黏膜呈高水平表达(表达阳性率分别为 65%,75%),在异常增生组的表达显著性降低(54.2%, $P<0.05$);bcl-2 及 survivin 在鳞癌组织中表达水平(70%,73.33%)显著高于异常增生和正常黏膜($P<0.05$),bax 则在异常增生组表达显著高于鳞癌和正常黏膜($P<0.05$)。口腔癌组织 Beclin1 的表达与 bcl-2、survivin、bax 的表达均密切相关($P<0.05$;相关系数分别为 $r=0.421, r=0.367, r=0.542$),四者均与肿瘤大小及颈部淋巴结转移密切相关。结论:Beclin1 与凋亡相关蛋白在口腔鳞癌的癌变过程中密切相关,自噬与凋亡可能协同参与口腔癌的进展。

[关键词] Beclin1 自噬 凋亡 口腔癌

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)10—0979—05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.10.017

Expression and Significance of Beclin1 and Apoptosis Related Proteins in Oral Carcinogenesis. SUN Weike, WANG Peiyuan, LIU Wei, WANG Xia*. Binzhou Medical University, Yantai 264000, China.

[Abstract] **Objective:** To study the clinical significance of Beclin1 and its relationship with bcl-2, survivin, and bax in oral carcinogenesis. **Methods:** Immunohistochemical SP method was used to detect the expression of Beclin1, bcl-2, survivin, and bax in oral carcinogenesis tissues including oral cancer (60 cases), oral dysplasia (48 cases), and normal oral mucosa (60 cases), and to study the clinical significance of Beclin 1 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its relationship with bcl-2, survivin, and bax expression in oral carcinogenesis. **Results:** The expression of Beclin1 was significantly increased in OSCC and normal mucosa (65% and 75%, respectively), and the positive expression rate in dysplasia significantly decreased (54.2%, $P<0.05$). Survivin and bcl-2 expression were higher in OSCC (73.33% and 70%) than in dysplasia and normal mucosa ($P<0.05$); the expression rate of bax increased in dysplasia than OSCC and normal mucosa ($P<0.05$). Beclin1, bcl-2, survivin, and bax expression was closely related to diameter of tumor and lymph node metastasis ($P<0.05$). The expression of Beclin1 was closely related to bcl-2, survivin, and bax ($P<0.05$; $r=0.421, 0.367$ and 0.542) in OSCC. **Conclusion:** Autophagy and apoptosis were involved in oral carcinogenesis, and were associated with invasion and metastasis of oral cancer, which synergistically participated in the development of oral cancer.

[Key words] Beclin1 autophagy apoptosis oral carcinoma

自噬,过去被称为Ⅱ型程序化细胞死亡,与凋亡共同参与生理性细胞死亡进程。目前观点认为,自噬是一种细胞自我保护机制,可通过清除降解受损细胞器并回收利用细胞内生物大分子获取能量,从而维持代谢平衡和内环境的稳定,是一种细胞存活的途径^[1]。自噬与凋亡之间存在复杂的交互调控关

系,二者常被多种应激刺激因素激活或抑制,甚至在某些条件下可以相互转化,共同参与了包括肿瘤在内的多种疾病的发生与发展^[2],但二者关系尚不明了。本研究通过检测自噬关键调节分子 Beclin1 与凋亡相关蛋白 bcl-2、survivin 及 bax 在口腔黏膜癌变过程中的表达,初步探讨口腔癌发生过程中自噬与凋亡的关系,进一步揭示口腔癌的发生发展机制。

1 材料与方法

1.1 临床资料 收集本院附属医院 2005 年 1 月~2015 年 12 月手术切除口腔鳞状细胞癌合并颈淋巴

作者简介 孙维克(1979~),女,山东人,讲师,硕士,研究方向:口腔癌、口腔黏膜病。

*通信作者 王霞,E-mail:wangxia7512@163.com

结清扫的标本 60 例。全部病例均未进行术前放疗,包括舌癌 29 例,牙龈癌 13 例,口底癌 8 例,唇癌 6 例,颊黏膜癌 2 例,软腭癌 2 例。所有标本的取材包括癌中央区、癌周缘区即癌浸润前沿、异常增生(48 例)及癌旁正常口腔黏膜。本研究已获得滨州医学院伦理委员会批准,且获得患者知情同意。

1.2 试剂与方法 兔抗人 Beclin1 多克隆抗体(AB55878, 1 : 300)(英国 Abcam 公司);兔抗人多克隆抗体 bcl-2(N-19, 1 : 200)、survivin(FL-142, 1 : 100)、bax(P-19, 1 : 100)及 PV-6000 免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥有限公司)。所有标本常规中性福尔马林固定,梯度酒精脱水处理后石蜡包埋,4 μm 连续切片。免疫组化检测严格按照说明书步骤进行,以已知阳性片作为阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定 以胞浆和/或胞膜出现黄色或棕黄色颗粒为阳性着色。各项免疫组化指标结果判读由 2 位病理医师分别双盲阅片,按肿瘤细胞阳性率和着色强度分别进行记分。肿瘤细胞阳性率记分标准^[3]:阳性细胞 $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分。着色强度记分标准:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。两种记分标准所得分值的乘积判断结果: < 3 为阴性, ≥ 3 为阳性。

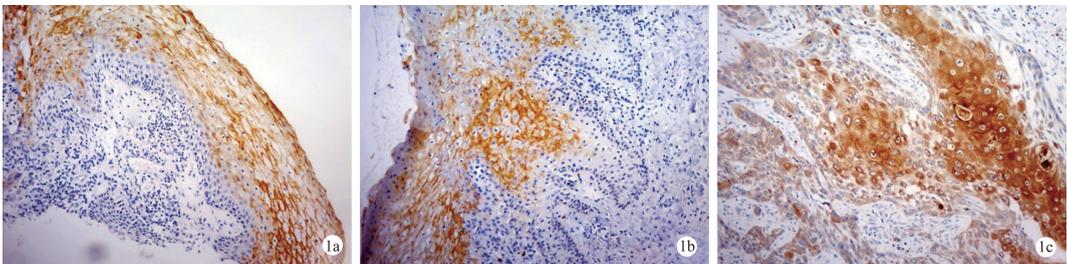
1.4 统计学分析 实验数据采用 SPSS 19.0 统计

学软件进行分析,不同组间阳性率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Beclin1 与凋亡相关蛋白 bcl-2、survivin 及 bax 在口腔鳞癌、异常增生及正常口腔黏膜组织中的表达 Beclin1 免疫组化阳性表达在胞膜或胞浆(图 1),在口腔鳞癌中呈高水平表达,表达阳性率为 65%(39/60),在口腔黏膜异常增生组表达阳性率有所下降(54.2%, 26/48),但两组间表达无显著性差异($\chi^2 = 0.072, P > 0.05$);癌旁正常口腔黏膜中 Beclin1 表达阳性率为 75%(45/60),与异常增生组相比差异有统计学意义($\chi^2 = 5.14, P < 0.05$;)。Bcl-2 与 survivin 呈现相似的表达规律(图 2、图 3),在口腔鳞癌中呈高水平表达(阳性率分别为 70%; 73.33%),显著高于异常增生组(阳性率分别为 45.83%; 37.5%)和正常口腔黏膜组(43.33%; 25%)($P < 0.05$)。Bax 在口腔鳞癌中表达阳性率为 40%(24/60)(图 4),而在异常增生组则呈高水平表达,表达阳性率达 77.08%(37/48),显著高于鳞癌组($P < 0.01$),见表 1。

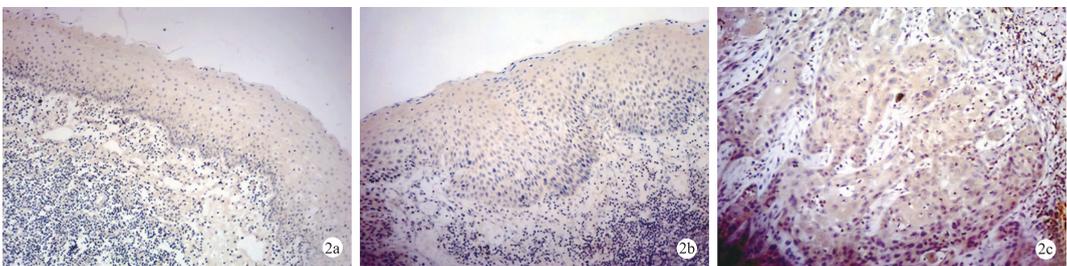
2.2 Beclin1 与凋亡相关蛋白 bcl-2、survivin 及 bax 与口腔癌患者临床病理参数的相关性分析 临床病理参数包括患者年龄、性别、吸烟史(采用吸烟指数进行判断:吸烟指数 = 每天吸烟的支数 \times 吸烟年数,吸烟指数 ≥ 400 判断为有吸烟史,吸烟指数 $<$



1a: Beclin1 在正常口腔黏膜组织中呈高水平表达;1b: Beclin1 在异常增生组织的表达降低;1c: Beclin1 在口腔鳞癌中表达呈强阳性

图 1 Beclin1 在口腔鳞癌癌变过程中的表达(SP, $\times 10$)

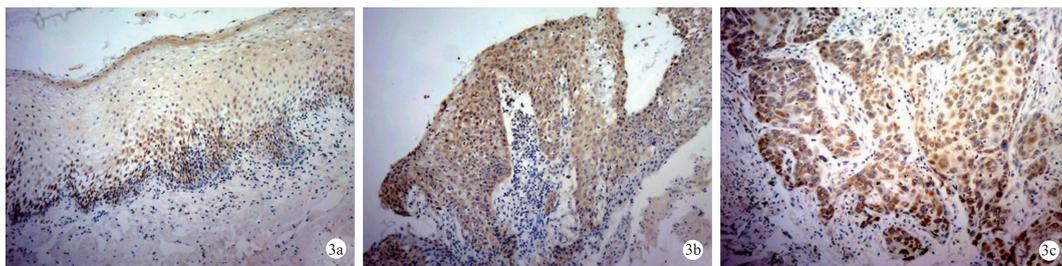
Fig. 1 Beclin1 expression in oral carcinogenesis (SP, $\times 10$).



2a: bcl-2 在正常口腔黏膜呈低表达;2b: bcl-2 在异常增生组织中呈低水平表达;2c: bcl-2 在口腔鳞癌中呈高水平表达

图 2 Bcl-2 在口腔鳞癌癌变过程中的表达(SP, $\times 10$)

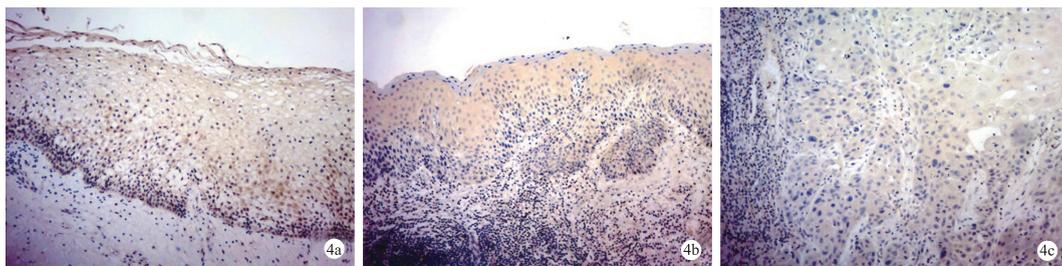
Fig. 2 Bcl-2 expression in oral carcinogenesis (SP, $\times 10$).



3a: survivin 在正常口腔黏膜中表达较弱; 3b: survivin 在异常增生组织中表达弱阳性; 3c: survivin 口腔鳞癌中表达呈强阳性

图 3 Survivin 在口腔鳞癌癌变过程中的表达(SP, ×10)

Fig. 3 Survivin expression in oral carcinogenesis (SP, ×10).



4a: 正常口腔黏膜; 4b: 异常增生组织; 4c: 口腔鳞癌

图 4 Bax 在口腔鳞癌癌变过程中的表达(SP, ×10)

Fig. 4 Bax expression in oral carcinogenesis (SP, ×10).

表 1 Beclin1、bcl-2、survivin 及 bax 在口腔鳞癌癌变过程中的表达

Tab. 1 The expression of Beclin1, bcl-2, survivin, and bax in oral carcinogenesis

例(%)

组别	例数	Beclin1		bcl-2		survivin		bax	
		+	-	+	-	+	-	+	-
鳞癌	60	39(65.00)	21(35.00)	42(70.00)	20(30.00)	44(73.33)	16(26.67)	24(40.00)	36(60.00)
异常增生	48	26(54.20)	22(45.80) [#]	22(45.83)	26(54.17) [*]	18(37.50)	30(62.50) [*]	37(77.08)	11(32.92) [*]
正常黏膜	60	45(75.00)	15(25.00)	26(43.33)	34(56.67) [*]	15(25.00)	45(75.00) [*]	25(41.67)	35(58.33)

注: * 表示该组与鳞癌组相比差异有统计学意义($P < 0.05$); # 表示该组与正常黏膜相比差异有统计学意义($P < 0.05$)

400 则判断为无吸烟史)、肿瘤大小/长径、鳞癌组织学分级、颈部淋巴结转移、临床 TNM 分期等。研究发现 Beclin1、bcl-2、survivin 及 bax 的表达均与肿瘤大小及颈部淋巴结转移密切相关($P < 0.05$)。Beclin1、bcl-2 及 survivin 与临床 TNM 分期密切相关($P < 0.05$); Beclin1、survivin 及 bax 与患者吸烟史有密切关系($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 Beclin1 的表达与 bcl-2、survivin、bax 在口腔癌变过程中表达的相关性分析 口腔鳞癌组织中 Beclin1 的表达与 bcl-2、survivin、bax 均密切相关($P < 0.05$; 相关系数分别为 $r = 0.421, r = 0.367, r = 0.542$); 在异常增生组 Beclin1 的表达与 survivin 密切相关($P < 0.05; r = 0.613$); 在正常口腔黏膜组 Beclin1 的表达与 bcl-2 有显著相关关系($P < 0.05; r = 0.497$), 见表 3。

3 讨论

口腔是机体与外界相通的门户, 时刻受到冷热

酸甜、烟酒、机械性损伤及病原微生物等多种因素的刺激和影响。因此, 口腔黏膜具有较强的维持自我稳态的能力。自噬是近年来提出的细胞进行自我保护的重要机制^[1], 当刺激超出细胞的自我保护能力, 自噬则会诱导凋亡^[4]。近来研究发现, 自噬与凋亡可以先后或同时发生共存于同一个细胞中, 在某些情况下二者可以互相拮抗或促进, 共同参与了包括肿瘤在内的多种疾病的发生与发展^[5,6], 但具体作用及机制尚不清楚。

Beclin1 基因是哺乳动物中最早发现的肿瘤抑制基因, 研究发现 Beclin1 基因的高表达正向激活自噬的活性, 增强细胞对内环境稳态的维持能力, 抑制肿瘤的发生^[7]。本研究发现 Beclin1 在正常口腔黏膜中呈高水平表达(阳性率为 75%), 异常增生组表达阳性率(54.2%)显著性下降, 鳞癌组织中 Beclin1 又显示较高水平表达(阳性率为 65%)。提示在正常口腔黏膜上皮内 Beclin1 的高表达可通过

表 2 Beclin1、bcl-2、survivin 及 bax 的表达与口腔癌患者临床病理参数的关系

Tab. 2 Relationship between the expression of Beclin1, bcl-2, survivin, and bax and the clinical pathological factors

参数	例数	Beclin1		P 值	Bcl-2		P 值	survivin		P 值	bax		P
		+	-		+	-		+	-		+	-	
年龄/岁													
≤56	29	16	13	>0.05	18	11	>0.05	21	8	>0.05	10	19	>0.05
>56	31	23	8		24	7		23	8		14	17	
性别													
男	37	26	11	>0.05	26	11	>0.05	30	7	>0.05	12	25	>0.05
女	23	13	10		16	7		14	9		12	11	
吸烟史													
有	39	31	8	<0.01	30	8	>0.05	32	7	<0.05	11	28	<0.05
无	21	8	13		12	9		12	9		13	8	
肿瘤大小/mm													
<25	14	5	9	<0.01	6	8	<0.05	7	7	<0.05	9	5	<0.05
≥25	46	34	12		36	10		37	9		15	31	
病理学分级													
I	42	27	15	>0.05	30	12	>0.05	33	9	>0.05	12	30	<0.01
II + III	18	12	6		12	6		11	7		12	6	
淋巴结转移													
有	39	30	9	<0.05	33	6	<0.01	34	5	<0.01	20	19	<0.05
无	21	9	12		9	12		10	11		4	17	
TNM 分期													
I + II	20	7	13	<0.05	9	11	<0.01	10	10	<0.01	5	15	>0.05
III + IV	40	32	8		33	7		34	6		19	21	

表 3 Beclin1 的表达与 bcl-2、survivin 及 bax 在口腔癌变过程中表达的相关性

Tab. 3 Correlation between Beclin1 expression and bcl-2, survivin, and bax in oral carcinogenesis

Beclin1	bcl-2		P 值	r	survivin		P 值	r	bax		P 值	r
	+	-			+	-			+	-		
鳞癌												
+	30	9	<0.05	0.421	31	8	<0.05	0.367	19	20	<0.01	0.542
-	12	9			13	8			5	16		
异常增生												
+	14	12	>0.05	-	13	13	<0.05	0.613	21	5	>0.05	-
-	8	14			5	17			16	6		
正常黏膜												
+	23	22	<0.05	0.497	11	34	>0.05	-	19	26	>0.05	-
-	3	12			4	11			6	9		

自噬发挥黏膜的自我保护作用。当病理性刺激持续作用下,细胞内产生的有害成分积累到一定程度,超过自噬所能调控的稳态范围,Beclin1 表达呈显著下降,细胞自我保护能力下降,减少异常增生的细胞积累。该现象提示自噬在口腔癌前病变阶段发挥肿瘤抑制作用。目前,多研究学者认为,自噬在肿瘤中可能发挥“双刃剑”的作用^[4,8];在肿瘤发生之前自噬发挥抑制肿瘤的作用,当肿瘤形成之后,自噬又发挥促进或维持肿瘤存活的作用,其作用的发挥取决于肿瘤的来源和类型及肿瘤的发展阶段^[4]。本研究口腔鳞癌中 Beclin1 表达较高水平表达,尤其在肿瘤中央区,表明自噬可能发挥保护肿瘤细胞的活性,耐受肿瘤中心缺氧微环境的作用。白宇等^[9] 研究报道自噬在 Tca83 细胞中具有双重作用,基础水平的自噬对细胞发挥保护作用,高活性的自噬可通过自噬

信号通路释放死亡信号,杀伤癌细胞。

凋亡,又称程序化细胞死亡,是细胞维持稳态的重要形式。凋亡受到众多复杂基因如促凋亡基因、抗凋亡基因等的严格控制。本实验中检测了口腔黏膜癌变过程中凋亡调控经典分子 bcl-2、survivin、bax 的表达。结果显示 bcl-2、survivin 在口腔癌中的表达显著高于异常增生组和正常口腔黏膜;Bax 在异常增生时表达水平显著高于口腔癌组和正常口腔黏膜组,三者均与鳞癌原发肿瘤的大小和颈部淋巴结转移密切相关。表明,凋亡参与了口腔癌的发生发展过程,抗凋亡蛋白 bcl-2、survivin 在口腔癌中的高水平表达,提示肿瘤抗凋亡能力提高,癌细胞企图通过逃避凋亡使得更多的细胞存活或增殖,从而促进肿瘤细胞的积累和生长。Survivin,又称为生存素,除了具有抗凋亡的功效外,还可以通过抑制

G1 期、促进细胞进入 S 期,加快细胞的分裂增殖^[10]。当病理性刺激因素引起轻微的 DNA 损伤时,DNA 修复基因进行及时的修复。但如果 DNA 损伤严重时,DNA 修复基因不能完成修复,则细胞进入凋亡进程。Survivin 的过度表达则会干扰细胞对 DNA 严重损伤的检测能力,使得受损、畸变的 DNA 进入有丝分裂期,畸变细胞大量积累,导致肿瘤的发生。本研究中 survivin 在口腔癌中阳性表达率显著增高,这与在其他实质性肿瘤如乳腺癌、胃癌等高表达结果一致^[11,12]。Bax 作为一种促凋亡基因在异常增生组呈高表达,而在口腔癌中表达下降。异常增生是口腔癌的发展前期阶段,该阶段大量细胞过度增殖,尤其是畸变细胞大量积累。在多种病理刺激下,为维持黏膜上皮结构的稳态,促凋亡基因被激活,凋亡增加,提示 bax 在该阶段通过促进凋亡发挥抑制肿瘤发生的功能。但在口腔癌组,bax 的表达被抑制,肿瘤细胞可能逃逸凋亡的进程,与抗凋亡基因的异常表达协同作用,使得瘤细胞凋亡减少,细胞的增殖凋亡平衡被打破,导致肿瘤的发展。

为初步探索自噬与凋亡在口腔癌发生发展过程中的相互作用,本实验分析 Beclin1 的表达与 bcl-2、survivin 及 bax 在口腔癌、异常增生及正常口腔黏膜表达相关性。Beclin1 作为自噬的正向调控蛋白在口腔癌中呈高水平表达,同时抗凋亡蛋白 bcl-2、survivin 也表现的相同的表达趋势,癌细胞通过提高自噬发挥细胞自我保护作用,而抗凋亡蛋白表达升高,细胞抗凋亡能力增强,促凋亡蛋白 bax 则表达下降,自噬与凋亡协同促进肿瘤增生,抑制凋亡。在异常增生组,Beclin1 与 survivin 表达均呈低表达,二者具有密切相关性。自噬水平降低表明细胞的自我保护能力下降;同时抗凋亡能力呈下降趋势,细胞凋亡增加,推测机体为维持口腔黏膜上皮的稳态,在异常增生阶段尽力清理过度增殖的细胞。当细胞增殖超越死亡的比例,进一步将转变为癌。在正常口腔黏膜 Beclin1 有较高水平的表达,而 bcl-2 的表达较低,Beclin1 通过较高的基础自噬水平进行细胞的自我保护,bcl-2 抗凋亡的水平下降,使得细胞存在一定程度的凋亡,自噬与凋亡相互协调,维持口腔黏膜上皮的稳定性。曾光等^[13]研究发现甘草查尔

酮 A 通过自噬信号通路抑制口腔鳞癌细胞自噬后,其凋亡活动显著增强,促进其抗肿瘤效果。因此,研究自噬与凋亡在口腔癌变过程中的变化及规律,将可能为口腔鳞癌的治疗提供新的思路。

综上所述,自噬调控蛋白 Beclin1 和凋亡相关蛋白(bcl-2、survivin、bax)在口腔黏膜癌变过程中表达水平的变化,显示自噬与凋亡可能相互作用参与口腔癌的发生与发展,但具体作用及机制复杂,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Long M, McWilliams TG. Monitoring autophagy in cancer: from bench to bedside [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, pii: S1044-579X(19)30007-0.
- [2] Guo JY, White E. Autophagy, metabolism, and cancer [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2016, 81:73-78.
- [3] 王霞,王培源,吴淑华,等. 口腔癌肿瘤出芽与 VEGF-C 的表达及淋巴结转移的相关性研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2012, 28(5):610-613.
- [4] Eskelinen EL. The dual role of autophagy in cancer [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(4): 294-300.
- [5] Liu G, Pei F, Yang F, et al. Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2), pii: E367.
- [6] 王霞,孙楷,肖长燕,等. 自噬在谷胱甘肽保护核糖碱致肝损害中的作用[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(6):660-664.
- [7] Kang R, Zeh HJ. The Beclin1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4):571-580.
- [8] Patil S, Rao RS, Raj AT. Dual role of autophagy in oral cancer [J]. *J Int Oral Health*, 2015, 7(6): i-ii.
- [9] 白宇,全海英,张桐菲,等. 顺铂诱导的自噬在口腔鳞癌 Tca83 细胞中的作用[J]. *口腔医学研究*, 2012, 28(6):566-569.
- [10] Hussain G, Ashfaq UA, Rahman M, et al. Computational screening of phytochemicals against survivin protein: A potent target for cancer [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2019, 32(3): 1145-1154.
- [11] Gu Y, Jin S, Wang F, et al. Clinicopathological significance of PI3K, Akt and survivin expression in gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(4):471-475.
- [12] Altieri DC. Targeting survivin in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(2): 225-228.
- [13] 曾光,卫克文. MAP4K3-mTOR 信号在甘草查而酮 A 诱导的鳞癌细胞自噬与凋亡中的作用研究[J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(12):1241-1245.

[收稿日期:2019-06-09]

(本文编辑 李四群)