文章编号:1000-5404(2012)13-1293-04

论著

Beclin 1 与 LC3 蛋白在腮腺多形性腺瘤及腮腺癌在多形性腺瘤中的表达和意义

李 冉[1],李 磊[3],刘 江[1],杨国海[2],姚雅琳[3] (063000 河北 唐山,河北联合大学:人体解剖与组织胚胎学教研室[1],口腔医学院[2];067000 河北 承德,承德医学院附属医院口腔科[3])

[摘要] **目的** 探讨自体吞噬相关基因 Beclin 1 和微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)表达和腮腺肿瘤之间的关系。**方法** 所用组织取自本院 2001－2009 年手术标本,用免疫组化法和免疫印迹法检测 20 例正常腮腺组织,37 例腮腺多形性腺瘤,41 例癌在多形性腺瘤中 Beclin 1 和 LC3 的表达,并结合临床病理因素进行分析。**结果** Beclin 1、LC3 在正常腮腺组织表达为(1.045±0.002)、(0.779±0.047),在腮腺多形性腺瘤中表达下降[(0.419±0.051)、(0.243±0.023),$P<0.05$],在癌在多形性腺瘤中二者阳性表达显著下降[(0.173±0.008)、(0.051±0.010),$P<0.05$]。淋巴结转移及 TNM 分期与 Beclin 1 的表达间有明显差异($P<0.05$),不同侵袭性,不同淋巴结转移组与 LC3 的表达间有明显差异($P<0.05$)。**结论** Beclin 1 和 LC3 在腮腺多形性腺瘤及癌在多形性腺瘤中表达下调,自体吞噬功能改变可能在腮腺肿瘤形成过程中具有一定作用。

[关键词] 多形性腺瘤;癌在多形性腺瘤中;自体吞噬;Beclin 1;微管相关蛋白 1 轻链 3
[中图法分类号] R446.8; R730.23; R739.87 [文献标志码] A

Expression and significance of Beclin 1 and LC3 in parotid pleomorphic adenoma and carcinoma in pleomorphic adenoma

Li Ran[1], Li Lei[3], Liu Jiang[1], Yang Guohai[2], Yao Yalin[3] ([1]Department of Anatomy and Histology Embryology, [2]Hospital of Stomatology, Hebei United University, Tangshan, Hebei Province, 063000; [3]Department of Stomatology, Affiliated Hospital, Chengde Medical College, Chengde, Hebei Province, 067000, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the expression of Beclin 1 and microtubule associated protein light 1 chain 3 (LC3) in parotid tumor. **Methods** Clinical data of 98 cases who admitted in our hospital from 2001 to 2009 were collected in this study. The collected tissue samples included 20 cases of normal parotid gland, 37 cases of parotid pleomorphic adenoma and 41 cases of carcinoma in pleomorphic adenoma. The expression of Beclin 1 and LC3 were assessed by immunohistochemistry and Western blotting. The correlation of Beclin 1 and LC3 expression with the clinicopathologic characteristics of the carcinoma in pleomorphic adenoma were analyzed. **Results** The positive rates of Beclin 1 and LC3 was highly in normal parotid gland (1.045±0.002 and 0.779±0.047), moderately in parotid pleomorphic adenoma (0.419±0.051, 0.243±0.023; $P<0.05$ *vs* normal tissue), and mildly in carcinoma in pleomorphic adenoma (0.173±0.008, 0.051±0.010, $P<0.05$ *vs* normal tissue). The expression of Beclin 1 showed significant difference with lymph node metastasis and TNM stage ($P<0.05$). The invasive of the tumor and lymph node metastasis showed significant difference with the LC3 expression ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of LC3 and Beclin 1 are down-regulated in parotid pleomorphic adenoma and carcinoma in pleomorphic adenoma. The changes of autophagic capacity may be related to the development of parotid gland tumor.

[**Key words**] pleomorphic adenoma; carcinoma in pleomorphic adenoma; autophagy; Beclin 1; microtubule associated protein 1 light chain 3

Supported by the Key Project of Medical Science Research of Hebei Provincial Department of Public Health (201105-23), the Supporting Project of Sci & Tech Research and Development of Hebei Province (11276135) and the Project of Sci & Tech Research and Development of Chengde. Corresponding author: Liu Jiang, Tel: 86-315-3725754, E-mail: on_jiangl@126.com

[基金项目] 河北省卫生厅医学科学研究重点课题(201105-23);河北省科技支撑计划(11276135);承德市科学技术研究与发展项目(201121032)
[通信作者] 刘 江,电话:(0315)3725754,E-mail: on_jiangl@126.com

多形性腺瘤(pleomorphic adenoma, PA)是腮腺区最常见的肿瘤,具有低度恶性潜能。其膨胀性生长易影响容貌,术后容易复发,多次复发后再次复发及癌变的几率均增加。腮腺癌在多形性腺瘤中(carcinoma in pleomorphic adenoma, CPA)约占涎腺恶性肿瘤的15%~20%,而且90%是由PA恶变所致,可危及生命,因此研究两者的生物特性、治疗及预后具有重要意义。

近年来自体吞噬与肿瘤的关系成为人们研究的热点。自体吞噬过程中有多种基因参与,其中Beclin 1的研究较为深入,Beclin 1在人类卵巢癌、乳腺癌等多种肿瘤中均可出现单等位缺失[1-2]。微管相关蛋白1轻链3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)是另一种参与自体吞噬的小蛋白质,是自体吞噬形成的标志性因子。本研究拟采用免疫组织化学法和蛋白免疫印迹技术检测正常腮腺组织、PA和CPA中Beclin 1和LC3的表达,探讨自体吞噬在PA及其恶变中的作用,为自体吞噬及其相关基因在腮腺肿瘤发生及进展过程中的作用提供新的证据。

1 资料与方法

1.1 材料来源

所用组织取自承德医学院附属医院口腔科2001-2009年手术标本,正常腮腺组织20例,PA组织37例,CPA组织41例。其中男性18例,女性21例,年龄37~61岁,非、微侵袭性12例,具有侵袭性29例;肿瘤直径≤4 cm 26例,肿瘤直径>4 cm 15例;有局部淋巴结转移8例,无明显转移灶33例;组织TNM分期:Ⅰ~Ⅱ期21例,Ⅲ~Ⅳ20例。正常腮腺组织取自于腮腺肿瘤周围腮腺组织,所有标本均选自术前无放疗、化疗的组织,标本经分装后,将用于免疫组织化学检测的样本行甲醛固定,蛋白免疫印迹检测的标本行液氮保存,所有病例均经临床和病理检查明确诊断。

1.2 主要试剂

Beclin 1单克隆抗体和LC3单克隆抗体购自美国Santa Cruze公司产品,β-actin购自美国Sigma公司。

1.3 免疫组织化学显色

切片脱蜡,水化。用3% H_2O_2去离子水孵育5~15 min,蒸馏水冲洗,PBS浸泡5 min,滴加山羊血清室温15 min,封闭非特异性抗原,滴加一抗Beclin 1(1∶100),Lc3(1∶200)4 ℃过夜,PBS冲洗,滴加二抗室温15 min,PBS冲洗,滴加S-P室温反应15 min,DAB显色。以PBS代替一抗作为阴性对照,使用试剂公司提供的阳性片作为阳性对照。所有切片采用双盲法由2位病理科医师独立阅片,细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞。CMIAS真彩色医学图像分析系统进行光密度测定,计算切片标本的平均光密度值。

1.4 Western blot

取出液氮保存组织加入裂解液,冰浴中匀浆,12 000 r/min,4 ℃离心5 min,取上清,考马斯亮蓝法蛋白质定量,样品制备,转膜、加入抗体(Beclin 1∶500; LC3 1∶400)、封闭、DAB显色。结果经计算机扫描后,自动图像分析系统进行半定量分析,在同一条件下测定目标条带整合光密度值,计算出各组样品目标条带与内参(β-actin)的整合光密度比值。

1.5 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 16.0统计软件,组间比较采用单因素方差分析及LSD-t检验,两个变量相关性分析采用双变量相关分析。

2 结果

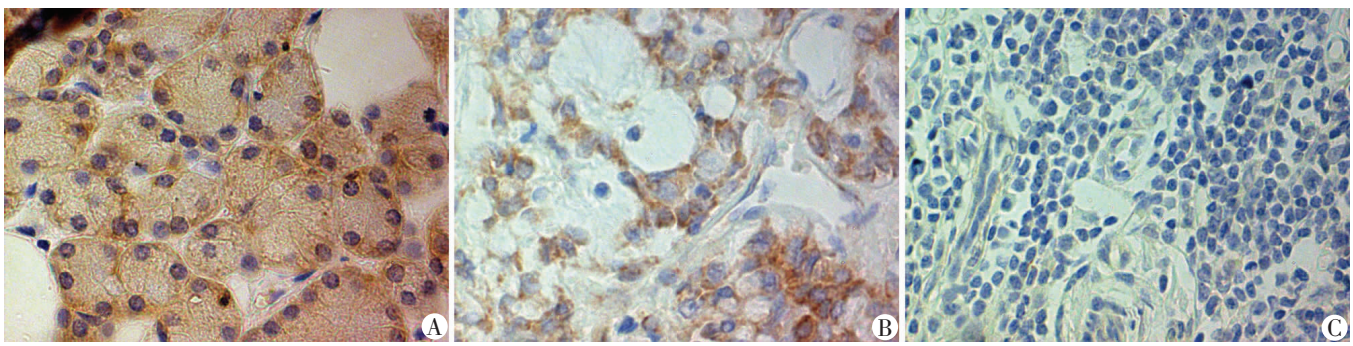
2.1 免疫组织化学法检测Beclin 1和LC3在各组织中的表达

Beclin 1和LC3阳性表达定位于细胞质。在正常腮腺组织中,可见Beclin 1、LC3的免疫反应阳性细胞大量表达。与正常组织比较,二者在PA组织中的表达下降($P<0.05$),在CPA组织中Beclin 1、LC3阳性表达显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$,表1,图1)。

表1 Beclin 1和LC3正常腮腺组织、PA和CPA中表达($\bar{x} \pm s$)

组织	n	Beclin 1	LC3
正常腮腺组织	20	1.045±0.002	0.779±0.047
PA组织	37	0.419±0.051[a]	0.243±0.023[a]
CPA组织	41	0.173±0.008[ab]	0.051±0.010[ab]

a:$P<0.05$,与正常腮腺组织比较; b: $P<0.05$,与PA组织比较

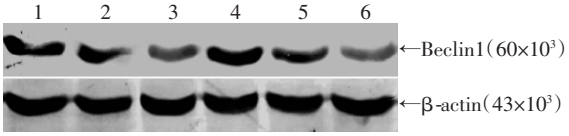


A:正常腮腺组织; B:PA组织; C:CPA组织

图1 3种腮腺组织切片LC3免疫组化观察 (S-P ×200)

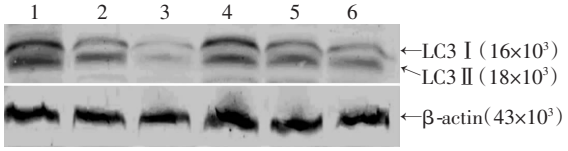
2.2 Western blot 检测 Beclin 1 和 LC3 在各组织中的表达

蛋白免疫印迹法与免疫组织化学法检测结果一致。正常腮腺组织中,Beclin 1 和 LC3 大量表达,分别为(2.309 ± 0.112)、(1.816 ± 0.108)。在 PA 组织中,二者条带 IDV 值明显降低,分别为(1.713 ± 0.114)、(1.049 ± 0.111),($P < 0.05$)。在 CPA 组织中 Beclin 1、LC3 阳性表达显著下降[(1.296 ± 0.110)、(0.620 ± 0.109),$P < 0.05$],见图 2、3。



1:正常腮腺组织;2:PA 组织;3:CPA 组织;4:正常腮腺组织;5:PA 组织;6:CPA 组织

图 2 Western blot 检测 Beclin 1 在各组腮腺组织中的表达



1:正常腮腺组织;2:PA 组织;3:CPA 组织;4:正常腮腺组织;5:PA 组织;6:CPA 组织

图 3 Western blot 检测 LC3 在各组腮腺组织中的表达

2.3 Beclin 1 和 LC3 与 CPA 临床病理因素的关系

由表 2 中可见,淋巴结转移及 TNM 分期与 Beclin 1 的表达间有明显差异($P < 0.05$),不同年龄,性别,侵袭性及肿瘤直径与 Beclin 1 的表达间无明显差异($P > 0.05$)。不同侵袭性,不同淋巴结转移组与 LC3 的表达间有明显差异($P < 0.05$),年龄,性别,肿瘤直径,TNM 分期与 LC3 表达间无明显差异。

表 2 Beclin 1 和 LC3 与 CPA 临床病理因素的关系(例)

临床病理因素	n	Beclin 1		LC3	
		阴性	阳性	阴性	阳性
年龄					
<50 岁	19	7	12	8	11
≥50 岁	22	8	14	10	12
性别					
男	18	6	12	9	9
女	23	9	14	9	14
侵袭性					
非、微侵袭	12	5	7	2	10[a]
侵袭性	29	10	19	16	13
肿瘤直径(cm)					
≤4	26	10	16	12	14
>4	15	5	10	6	9
淋巴结转移					
有	8	6	2[a]	7	1[a]
无	33	9	24	11	22
TNM 分期					
Ⅰ~Ⅱ	21	4	17[a]	8	13
Ⅲ~Ⅳ	20	11	9[a]	10	10

a:$P < 0.05$,与阴性比较

3 讨论

自体吞噬性细胞死亡是程序性细胞死亡的一种,亦称为Ⅱ型程序性细胞死亡,是一种有异于凋亡,不依赖于 Caspase 的程序性细胞死亡。目前研究发现,在多种人类肿瘤中均存在自体吞噬活性的改变[3-4]。Beclin 1 是酵母自噬相关基因 Atg6 (autophagy-related genes 6)的哺乳动物同源基因,含有 12 个外显子,编码 450 个氨基酸,60×10^3 卷曲螺旋状蛋白。Beclin 1 基因定位于染色体 17q21,是自体吞噬的执行者,在多种人类癌细胞中缺失,而且 Beclin $1^{+/-}$ 老鼠更易生发肿瘤[5]。本实验条件下,Beclin 1 在 PA 组织中的表达下降,在 CPA 组织中 Beclin 1 阳性表达显著下降,提示自噬水平的改变参与了腮腺肿瘤的病理进程。Beclin 1 可能为抑癌基因[6]。研究证实在对 17 例乳癌组织的检测中,有 56% 的病例 Beclin 1 蛋白表达明显下降[7],而在对 22 例乳癌细胞系的基础研究中,亦发现 41% 的细胞株存在 Beclin 1 等位基因的缺失[6]。在 PA 及其恶变后,自体吞噬相关因子的表达是否发生变化?其是否参与了肿瘤的病理进程或转归? 在肝癌细胞中,自体吞噬和 Beclin 1 下调程度可能和肿瘤恶性度和分型相关[8]。本研究的 3 种组织中 Beclin 1 的表达随恶性程度增加而减少,在 CPA 中的表达显著低于 PA 和正常腮腺组织,提示恶性肿瘤的发展过程中存在自体吞噬功能的减弱,自体吞噬活动的改变不仅参与了肿瘤的形成,而且其动态变化可能和腮腺肿瘤的恶性程度相关。

LC3 是哺乳动物细胞中酵母 ATG8 基因的同源物,定位于胞浆和自噬泡膜表面,参与自体吞噬体的形成。LC3 在自噬体膜的延伸过程中起到重要作用[9],被认为是自噬体的标志分子[10]。本研究中在正常腮腺组织中 LC3 表达强阳性,在 PA 和 CPA 组织中表达显著下调,说明在这两种病变中自体吞噬活性明显降低。

淋巴转移是判断腮腺恶性肿瘤预后的重要指标,在有淋巴结转移组的 8 例中,Beclin 1 和 Lc3 的表达阳性数分别为 2 例和 1 例,阳性率分别为 25% 和 12.5%。有无淋巴结转移与 Beclin 1 和 LC3 的表达间有显著性关系。Beclin 1 的表达随 TNM 分期的增高而降低,阳性率分别为 81% 和 45%,差异有显著性意义,提示 Beclin 1 和 LC3 的阳性率可能与 CPA 的预后有关。

目前,对于自体吞噬在肿瘤中的作用尚无定论,其既可以诱导也可以防止癌症的发生,它的作用在肿瘤的进展中可能是不断变化的。有研究证实鼠的胰腺细胞经致癌物质诱导后,在癌变前期自体吞噬能力加强,当癌变完成以后,自噬能力反而减弱。提示自体吞噬能力的衰退可能有助于肿瘤的恶化[11]。而自噬相关基因究竟通过何种途径调控腮腺肿瘤的发生、发展,本课题组将在后续实验中进一步论证。

参考文献：

[1] Thorburn A, Debnath J. Targeting chaperone-mediated autophagy in cancer[J]. Sci Transl Med, 2011, 3(109): 109 – 145.

[2] Singh P, Godbole M, Rao G, *et al*. Inhibition of autophagy stimulate molecular iodine-induced apoptosis in hormone independent breast tumors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 415(1): 181 – 186.

[3] Yu J, Parkhitko A, Henske E P. Autophagy: an 'Achilles' heel of tumorigenesis in TSC and LAM[J]. Autophagy, 2011, 7(11): 1400 – 1401.

[4] Trocoli A, Djavaheri-Mergny M. The complex interplay between autophagy and NF-κB signaling pathways in cancer cells[J]. Am J Cancer Res, 2011, 1(5): 629 – 649.

[5] Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, *et al*. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3[J]. J Biol Chem, 2007, 282(25): 18573 – 18583.

[6] Qu X, Yu J, Bhagat G, *et al*. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene[J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1809 – 1820.

[7] Liang X H, Yu J, Brown K, *et al*. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function[J]. Cancer Res, 2001, 61(8): 3443 – 3449.

[8] Ding Z B, Shi Y H, Zhou J, *et al*. Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2008, 68(22): 9167 – 9175.

[9] Yang Z, Klionsky D J. An overview of the molecular mechanism of autophagy[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2009, 335: 1 – 32.

[10] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy[J]. Int J Bioehem Cell Biol, 2004, 36(12): 2491 – 2502.

[11] Levine B. Cell biology: autophagy and cancer[J]. Nature, 2007, 446(7137): 745 – 747.

（收稿：2011-11-30；修回：2012-02-12）

（编辑　吴培红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2012)13-1296-01

经小切口皮下隧道祛除部分组织重睑术185例临床分析

谷　琪[1]，齐红莉[2]　（563000 贵州 遵义，遵义医学院附属医院美容医院外科[1]；710000 西安，西安市中心医院烧伤整形科[2]）

［关键词］　小切口；皮下隧道；重睑术

［中图法分类号］　R622　［文献标志码］　B

重睑成形术是常见的美容手术，一般为切开法、埋线法及缝扎法。埋线法和缝扎法术后线结易脱落，重睑线易消失；切开法术后恢复慢，切口线瘢痕明显[1-2]。我科自2009年10月至2011年6月，对185例单睑患者采用经小切口皮下隧道祛除部分组织的重睑术，创伤小、术后反应轻、瘢痕不明显、重睑效果稳定持久，现报告如下。

1　资料与方法

1.1　临床资料

本组185例均为门诊患者。女性172，男性13例，平均年龄27(18～35)岁。受术者上睑皮肤，无明显松弛。

1.2　手术方法

1.2.1　切口设计　受术者端坐位，结合受术者面部形态特征，双眼特点和审美观，测试出重睑的最佳位置和走向，用美蓝标记一圆滑的弧线。在此弧线上距内眦角2 mm、上睑最高点以及外眦处，各设计一长3 mm的横切口。

1.2.2　手术步骤　以2%利多卡因(含1∶200 000肾上腺素)局部浸润麻醉。用11号刀片沿设计线上三切口处切开皮肤，深达眼轮匝肌层，用眼科剪紧贴皮肤在切口之间进行锐性剥离，在皮下形成一个贯通隧道，内侧达内眦角上方，外侧达外眦角外5 mm，向下达近睑缘处。用组织剪将隧道下的眼轮匝肌剪出宽约2 mm，深达睑板前筋膜处。对于上睑肥厚者，特别是肿泡眼，于外侧切口处打开眶隔，剪除眶隔疝出的多余脂肪，使上睑变薄，重睑成形更趋自然。用7-0尼龙线将切口上皮下组织——切口下皮下组织——睑板前筋膜进行缝合，线结埋于皮下。先缝合中间最高点，再缝合两侧切口，术中可观察重睑弧线是否流畅，并进行调整。切口皮肤进行间断缝合。术后切口处涂抹抗生素软膏，无菌纱布覆盖伤口，冰袋冰敷20 min。

2　结果

本组15例术后出现血肿，术后48 h内冰敷，48 h后热敷，同时口服活血化瘀药物，1周后血肿消退。12例患者重睑线外侧消失，于外侧小切口处再次去除外眦外少量眼轮匝肌。其余患者术后7 d拆线，消肿快，无明显瘢痕，重睑形态流畅自然，随访6～12个月重睑线稳定，患者满意。见图1。



A：术前；B：术后2个月

图1　经小切口皮下隧道祛除部分组织的重睑手术前后对比观察

［通信作者］　谷　琪，E-mail：guqi33@sina.com

（下转1303页）