文章编号:1000-5404(2013)12-1271-03

论著

Beclin-1在非小细胞肺癌中的表达与意义

肖 瑜,龙 驰,张明慧,罗 焱,胡义德 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所)

[摘要] **目的** 探讨自噬重要调控因子Beclin-1在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达及其临床意义。**方法** 收集150例非小细胞肺癌患者的癌组织及癌旁组织并制成组织芯片,应用免疫组化的方法检测Beclin-1在肺癌组织及癌旁组织中的表达情况。分析Beclin-1的表达与肺癌不同临床参数之间的关系并对病例进行生存分析。**结果** Beclin-1在肺癌组织的阳性表达率(26.00%)显著低于癌旁组织(82.00%)($P<0.05$);肺鳞癌组织中Beclin-1的阳性表达率(34.66%)显著高于肺腺癌(17.34%)($P<0.05$);Beclin-1的表达率在不同性别、年龄、分化程度、淋巴结转移、远处转移组间无显著差异($P>0.05$);Beclin-1阴性表达的非小细胞肺癌患者的生存率显著低于阳性表达的患者($P<0.05$)。**结论** Beclin-1可能是一个非小细胞肺癌治疗的新的靶点,有可能成为非小细胞肺癌病理类型判断的辅助指标和预后评估候选指标之一。

[关键词] 非小细胞肺癌;自噬;Beclin-1;组织芯片
[中图法分类号] R446.9;R730.23;R734.2 [文献标志码] A

Expression of Beclin-1 in non-small cell lung cancer and its clinical significance

Xiao Yu, Long Chi, Zhang Minghui, Luo Yan, Hu Yide (Institute of Ocancer, Diagnosis and Treatment, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression level of an important autophagy-related factor Beclin-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its clinical significance. **Methods** The specimens of carcinoma tissues and their paired para-carcinoma tissues collected from 150 NSCLC patients were made into tissue microarray. Immunohistochemistry (IHC) was applied to detect the expression level of Beclin-1 in these specimens. The correlation between the expression level of Beclin-1 and the survive rate of patients with NSCLC was analyzed. **Results** The positive expression rate of Beclin-1 in the carcinoma tissues (26.00%) was significantly lower than that in the para-carcinoma tissues (82.00%) ($P<0.05$), and the positive expression rate of Beclin-1 in squamous cell carcinoma tissues (34.66%) was significantly higher than that in the adenocarcinoma tissues (17.34%) ($P<0.05$). However, no evidence showed the expression rate of Beclin-1 was correlated with sex, age, degrees of differentiation, lymph node metastasis and distant metastasis ($P>0.05$). The survive rate of the NSCLC patients with negative expression of Beclin-1 was significantly lower than that of the NSCLC patients with positive expression of Beclin-1 ($P<0.05$). **Conclusion** Beclin-1 may be used as a new target for NSCLC treatment and as a potential indicator for pathological diagnosis and prognostic prediction of NSCLC.

[**Key words**] NSCLC; autophagy; Beclin-1; tissue chip

Corresponding author: Hu Yide, E-mail: huyide_mit@yahoo.com.cn

近年来,恶性肿瘤的发病率和病死率一直呈上升趋势,其中肺癌的病死率在过去30年上升得尤为明显。国际癌症研究署(IARC)的数据表明全世界每年有120万新增的肺癌病例,每年有110万人死于肺癌。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌总数的85%,其5年生存率仅16%[1-2]。目前对肺癌的发生、发展机制了解得还不十分透彻,对肺癌预后判断的有效指标也不多,因此对肺癌尤其是小细胞肺癌进行更加深入的研究对加深了解肺癌的发生、发展机制和更好的判断其预后有着重要的意义。

自噬在肿瘤的发生、发展中具有举足轻重的作用。自噬可通过降解目的蛋白、蛋白聚合物以及受损细胞器等方式来调控细胞的稳态;也可以通过限制炎症、清除有毒的未折叠蛋白,除去受损线粒体等机制来抑制肿瘤早期形成。而随着肿瘤发展,自噬又可协助肿瘤细胞对抗不利环境,促进肿瘤演进[3-4]。目前有研究

[通信作者] 胡义德,E-mail: huyide_mit@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130508.0910.001.html(2013-05-08)

显示肺癌早期的形成与自噬活性的下降有关,但也有研究报道在肺癌进展后期,自噬活性上升,促进肺癌的进展,影响肺癌的药物治疗[5-7]。根据肺癌不同发展阶段有针对性进行自噬调控,已经成为未来肺癌治疗的新策略之一。

Beclin-1是自噬的一个重要调控因子,有研究表明,Beclin-1在肺癌中可作为肿瘤抑制基因,其下调导致自噬、凋亡的缺陷,从而促进肺癌的发生、发展。而Beclin-1的表达与肺癌的组织学类型、分化程度、淋巴结转移、远处转移、性别、年龄等临床参数的相关性研究的结论分歧较大,因此我们应用组织芯片技术和免疫组化方法对Beclin-1在非小细胞肺癌组织及癌旁组织中的表达情况进行检测,对非小细胞肺癌中Beclin-1的表达与肺癌临床参数及患者生存曲线进行分析,初步探讨Beclin-1在肺癌检测和预后方面的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 标本来源

非小细胞肺癌组织和相应癌旁组织的组合芯片购自上海芯超生物技术有限公司。共纳入2004年7月至2009年7月150例非小细胞肺癌及对应的癌旁组织(至少距癌边缘2~3 cm),非小细胞肺癌的临床参数资料由公司提供。未经放、化疗处理的原发性肺鳞癌、肺腺癌组织各75例,其中肺鳞癌男性49例,女性26例,年龄31~77岁,平均54岁。肺腺癌男性33例,女性42例,年龄35~77岁,平均56岁。高中分化肺鳞癌32例,低分化肺鳞癌43例。高中分化肺腺癌20例,低分化肺腺癌55例。以通过收集门诊复查病历及电话联系的方式进行随访,生存时间按月记录,随访终点为死亡,随访截止日期为2011年12月。

1.2 检测方法

将癌组织及对应癌旁组织制成组织芯片,按常规S-P法进行Beclin-1的免疫组化检测。S-P试剂盒购自中杉生物技术有限公司。以磷酸盐缓冲溶液(PBS)代替一抗作为阴性对照,以已知的阳性表达肺癌组织切片为阳性对照。

1.3 Beclin-1表达的判定标准

Beclin-1阳性表达见于细胞质,为棕黄色颗粒。每张切片由两位病理医师在不了解其临床和病理资料的情况下,对免疫组织化学检测结果进行双盲法随机观察5个高倍视野,计数100个细胞,依据阳性细胞比率及着色深度分别评估,最后综合评定。无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;阳性细胞评分标准:显微镜下随机取5个视野,根据每个视野中癌细胞或肺泡上皮细胞的阳性细胞比例进行评分,<5%为0分,5%~10%为1分,11%~50%为2分,>50%为3分;总分=着色深度评分×阳性细胞比率评分。0分记号为"-",1~5分为"+",>6分为"++"。

1.4 统计学方法

应用SPSS 20.0统计软件对所有资料进行统计学分析。计数资料以率(%)表示,组间比较采用χ^2检验。采用Kaplan-Meier法进行生存分析,进行log-rank非参数检验。

2 结果

2.1 肺癌组织和癌旁组织中Beclin-1的表达

Beclin-1在肺癌组织及癌旁组织中的表达情况见表1和图1,Beclin-1在肺癌癌旁组织中的表达率显著高于肺癌组织($P<0.05$)。

表1 Beclin-1在肺癌和癌旁组织中的表达($n=150$)

组织来源	Beclin-1的表达(例)			阳性率(%)
	-	+	++	
肺癌组织	111	13	26	26.00[a]
癌旁组织	27	109	14	82.00

a: $P<0.05$,与癌旁组织比较

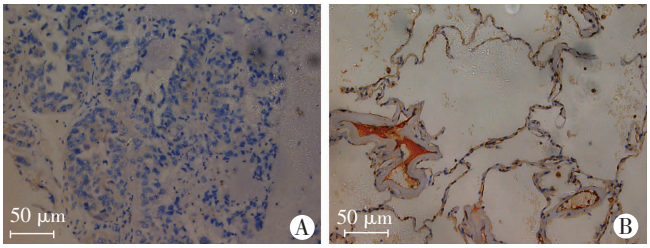


图1 免疫组化测Beclin-1在肺癌(A)和癌旁组织(B)中的表达

2.2 肺癌组织中Beclin-1的表达与肺癌患者不同临床参数之间的关系

Beclin-1的表达在不同性别、年龄、分化程度、淋巴结转移和远处转移等组间无显著性差异($P>0.05$,表1),而在不同病理类型组间差异显著($P<0.05$,表2)。

表2 Beclin-1在肺癌组织中的表达及其与不同临床参数之间的关系[例(%)]

临床参数	n	Beclin-1的表达		
		-	+	++
性别				
男	82	61(74.40)	4(4.88)	17(20.73)
女	68	50(73.53)	9(13.24)	9(13.24)
年龄(岁)				
≥60	59	39(66.10)	6(10.17)	14(23.73)
<60	91	72(79.12)	7(7.69)	12(13.19)
病理类型				
鳞癌	75	49(65.33)	6(8.00)	20(26.67)[a]
腺癌	75	62(82.67)	7(9.33)	6(8.00)
分化程度				
高中分化	52	38(73.08)	4(7.69)	10(19.23)
低分化	98	73(74.49)	9(9.18)	16(16.33)
淋巴结转移				
无	63	47(74.60)	4(6.35)	12(19.05)
有	87	64(73.56)	9(10.34)	14(16.09)
远处转移				
有	47	34(72.34)	3(6.38)	10(21.28)
无	103	77(74.76)	10 (9.71)	16(15.53)

a: $P<0.05$,与腺癌比较

2.3 肺癌组织中Beclin-1的表达与肺癌患者预后的关系

生存曲线显示:Beclin-1阴性病例与阳性病例患者的生存率存在显著差异,Beclin-1蛋白阴性表达组的生存率显著低于阳性表达组($P<0.05$,图2)。

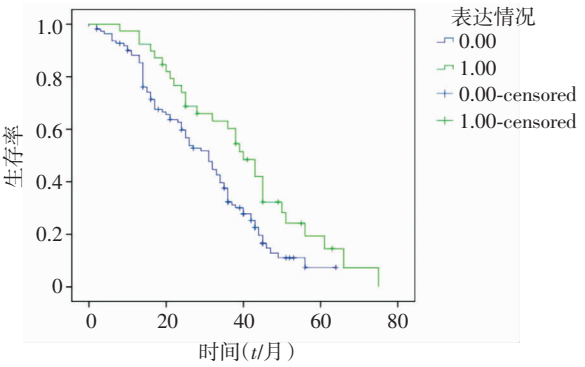


图 2　Beclin-1 阴性、阳性表达的肺癌患者的生存曲线

3　讨论

目前,对非小细胞肺癌的治疗仍是以手术为主,辅以放射治疗和化学治疗的综合治疗。虽然新的化疗药物的出现和分子靶向药物的诞生使非小细胞肺癌的治疗取得了一定的进展,但是总体治疗效果仍然不令人满意,同时仍有部分患者不能从上述治疗中获益。随着对非小细胞肺癌的细胞生物学和分子生物学机制理解的深入,寻找非小细胞肺癌治疗的新靶点成为目前肿瘤研究的热点。

早在 1962 年科学家就已经发现了自噬现象,经过了 50 多年的研究发现自噬在肿瘤中的作用具有异质性[8]。Beclin-1 是酵母自噬基因 Atg6/Vps30 的同源基因,在自噬的过程中发挥重要的调控作用。已有的研究发现,在不同的肿瘤细胞中,Beclin-1 的表达并不一致。如 Beclin-1 高表达于乳腺癌和食管癌组织,而在肺癌组织中呈低表达[9-11]。此外,在不同的外部因素作用下,Beclin-1 也发挥着不同的功能[12-14],或作为抑癌基因抑制肿瘤发生,或启动自噬的防御机制,清除细胞质内损伤的细胞器或代谢产物保护受损细胞,促进细胞存活[15]。

本研究发现非小细胞肺癌组织中 Beclin-1 蛋白的表达显著低于癌旁组织,这一结果与文献报道肺癌中 Beclin-1 表达下降一致[9-11],同时也支持 Beclin-1 在非小细胞肺癌中下调引起自噬、凋亡的缺陷,从而促进肺癌的发生和发展的理论,从而提示 Beclin-1 有可能是一个非小细胞肺癌治疗的新靶点,值得我们为之展开更加深入的研究。目前 Beclin-1 在肺癌不同病理类型中的表达情况鲜有报道,我们的研究结果显示,Beclin-1 蛋白在非小细胞肺癌鳞癌组表达显著高于腺癌组,提示 Beclin-1 蛋白表达可能与肺癌的病理类型相关,有可能作为肺癌组织类型判断的辅助指标之一。同时,本研究还发现,Beclin-1 的表达在不同淋巴结转移组和不同远处转移组之间均未见显著性差异,说明 Beclin-1 的表达可能与肺癌的转移和侵袭与否无关。我们进一步利用生存曲线分析了 Beclin-1 表达与患者预后的关系,结果显示:Beclin-1 阴性表达组显著低于阳性表达组,提示 Beclin-1 阴性表达患者的预后较阳性表达者差,Beclin-1 可能作为非小细胞肺癌的预后评估候选指标之一。

综上所述,我们认为 Beclin-1 的表达在肺癌组组织与癌旁组织间差异显著,Beclin-1 可能是非小细胞肺癌的抑癌基因之一,它有可能作为一个非小细胞肺癌治疗的新的靶点,可作为肺癌组织类型判断的辅助指标之一,同时它也可作为非小细胞肺癌的预后评估候选指标之一。

参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
[2] Jaboin J J, Hwang M, Lu B. Autophagy in lung cancer[J]. Methods Enzymol, 2009, 453: 287-304.
[3] Chen L, Liu Q, Huang Z, *et al*. Tripchlorolide induces cell death in lung cancer cells by autophagy[J]. Int J Oncol, 2012, 40(4): 1066-1070.
[4] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(12): 961-967.
[5] Liu J, Lin Y, Yang H, *et al*. The expression of p33(ING1), p53, and autophagy-related gene Beclin1 in patients with non-small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2011, 32(6): 1113-1121.
[6] Moreira-Leite F F, Harrison L R, Mironov A, *et al*. Inducible EGFR T790M-mediated gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells does not modulate sensitivity to PI103 provoked autophagy[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(6): 765-777.
[7] Newman A C, Scholefield C L, Kemp A J, *et al*. TBK1 kinase addiction in lung cancer cells is mediated via autophagy of Tax1bp1/Ndp52 and non-canonical NF-κB signalling[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50672.
[8] Ali A B, Nin D S, Tam J, *et al*. Role of chaperone mediated autophagy (CMA) in the degradation of misfolded N-CoR protein in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25268.
[9] Wang Y, Peng R Q, Li D D, *et al*. Chloroquine enhances the cytotoxicity of topotecan by inhibiting autophagy in lung cancer cells[J]. Chin J Cancer, 2011, 30(10): 690-700.
[10] Sirichanchuen B, Pengsuparp T, Chanvorachote P. Long-term cisplatin exposure impairs autophagy and causes cisplatin resistance in human lung cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 364(1/2): 11-18.
[11] Lee J G, Wu R. Combination erlotinib-Cisplatin and Atg3-mediated autophagy in erlotinib resistant lung cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e48532.
[12] Hsin I L, Ou C C, Wu T C, *et al*. GMI, an immunomodulatory protein from Ganoderma microsporum, induces autophagy in non-small cell lung cancer cells[J]. Autophagy, 2011, 7(8): 873-882.
[13] Gorzalczany Y, Gilad Y, Amihai D, *et al*. Combining an EGFR directed tyrosine kinase inhibitor with autophagy-inducing drugs: a beneficial strategy to combat non-small cell lung cancer[J]. Cancer Lett, 2011, 310(2): 207-215.
[14] Acharya B R, Bhattacharyya S, Choudhury D, *et al*. The microtubule depolymerizing agent naphthazarin induces both apoptosis and autophagy in A549 lung cancer cells[J]. Apoptosis, 2011, 16(9): 924-939.
[15] Carew J S, Medina E C, Esquivel J A 2nd, *et al*. Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis *via* ubiquitinated protein accumulation[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(10): 2448-2459.

(**收稿**:2013-03-11;**修回**:2013-04-03)
(编辑　汪勤俭)