

Beclin1、LC3 和 mTOR 在肝癌中的表达及临床意义

于海^a,刘清华^a,肖培伦^a,王健欣^a,张明^a,蒋吉英^a,李进^a,于丽^b,于树娜^a

(潍坊医学院临床医学院 a. 人体解剖学教研室, b. 组织胚胎学教研室, 山东 潍坊 261053)

摘要:目的 通过检测 Beclin1、LC3 和雷帕霉素靶蛋白(mTOR)在肝癌组织中的表达,并结合各相关临床病理指标,从而探讨 Beclin1、LC3 和 mTOR 的表达水平在肝癌发生发展中的作用及其相互之间的关系。方法 采用免疫组织化学技术,检测 56 例肝癌组织和 40 例正常肝脏组织中 Beclin1、LC3 和 mTOR 蛋白的表达情况,并分析二者与肝癌各相关临床病理特征之间的关系。结果 Beclin1、LC3 和 mTOR 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率分别为 75%、70% 和 50%,均明显高于正常肝组织中的阳性表达率 25%、30%、28%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Beclin1 与 LC3 在肝癌中表达呈正相关($r = 0.643, P < 0.01$),与 mTOR 表达之间无明显相关性($r = -0.167, P > 0.05$)。LC3 与 mTOR 表达呈负相关($r = -0.386, P < 0.01$)。Beclin1、LC3 和 mTOR 的表达均与年龄、性别、肿瘤大小、HBSAg、AFP 值等均无显著相关性($P > 0.05$),但与病理学分级和有无胆管癌栓有关($P < 0.05$)。结论 Beclin1、LC3 和 mTOR 的异常高表达可能与肝癌的发生关系密切。

关键词: Beclin1; LC3; 雷帕霉素靶蛋白; 肝癌; 免疫组化; 自噬

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.02.014

Expression and clinical significance of Beclin1, LC3 and mTOR in hepatic carcinoma

YU Hai^a, LIU Qinghua^a, XIAO Peilun^a, WANG Jianxin^a, ZHANG Ming^a, JIANG Jiyong^a, LI Jin^a, YU Li^b, YU Shuna^a

(a. Department of Anatomy; b. Department of Histology and Embryology, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Beclin1, LC3 and mTOR protein in hepatic carcinoma, and study their correlations to the clinicopathologic characteristics. To explore the effect of Beclin1, LC3 and mTOR protein expression in the occurrence, development of hepatic carcinoma and their interrelation. **Methods** The expression of Beclin1, LC3 and mTOR protein in 56 cases of hepatic carcinoma, 40 cases of normal liver tissues were detected by immunohistochemistry. At the same time, to investigate the relativity and clinicopathologic characteristics of expression of Beclin1, LC3 and mTOR in hepatic carcinoma. **Results** The positive expression rate of Beclin1, LC3 and mTOR in hepatic carcinoma was significantly higher than normal liver tissues, with significant difference ($P < 0.05$). The expression of Beclin1 was positively correlated with LC3 ($r = 0.643, P < 0.01$) and was not associated with mTOR ($r = -0.167, P > 0.05$), and the expression of LC3 was negatively correlated with mTOR in hepatic carcinoma ($r = -0.386, P < 0.01$). The expression of Beclin1, LC3 and mTOR showed no obvious correlations with the age, gender, tumor size, HBSAg and serous alpha-fetoprotein (AFP) ($P > 0.05$), but were correlated with pathological grading and biliary tumor thrombi ($P < 0.05$). **Conclusion** The abnormal expression of Beclin1, LC3 and mTOR are closely associated with the occurrence and development of hepatic carcinoma.

Keywords: Beclin1; LC3; mTOR; hepatic carcinoma; immunohistochemistry; autophagy

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,病死率极高。据统计调查显示,每年大约有 13 万人死于肝癌^[1]。虽然肝癌的临床治疗已经取得了一定的进展,但发病率和病死率仍然居高不下,因此,肝癌的发生发展、侵袭转移等机制的研究一直备受关注。

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2014HL021, ZR2014HL020, ZR2014JL016);山东省医药卫生科技发展计划资助课题(2014WS0464);潍坊市科学技术发展计划项目(2015WS041)

通信作者:于树娜,女,副教授,硕士生导师,研究方向:肝损伤与肝癌, E-mail: yushn@126.com

近年来,有研究发现,自噬活性的异常改变与肿瘤的发生、发展等密切相关^[2-6]。本研究应用免疫组织化学 SP 法,检测 Beclin1、LC3 和雷帕霉素靶蛋白(mTOR)三种自噬基因在肝癌组织及正常肝组织中的表达,并结合各相关临床病理指标,探讨 Beclin1、LC3 和 mTOR 的表达水平在肝癌发生发展中的作用及其相互之间的关系,从而为肝癌诊疗及判断预后找到分子标志物,制定合理、有效的治疗方案,最终提高患者的生存率。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集潍坊医学院附属医院和齐鲁

医院 2013 年 12 月—2016 年 12 月肝癌手术切除标本 56 例,标本均经病理切片 HE 染色证实为肝癌,所有病例术前均未接受任何放化疗、肝动脉栓塞及免疫治疗。按 Edmondson-steiner 分级标准:I 级 8 例,II 级 14 例,III 级 24 例,IV 级 10 例;分别测量切除后的肿瘤直径,其中 ≤ 5 cm 者 24 例, > 5 cm 者 32 例。收集肝癌标本中,男性 40 例,女性 16 例;年龄 34 ~ 80 岁,平均 62 岁;乙肝表面抗原(HBSAg)阳性者 38 例,阴性表达者 18 例;甲胎蛋白 AFP $\geq 400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 30 例, $< 400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 26 例;有胆管癌栓者 11 例。同时取癌旁 5 cm 外正常肝组织标本 40 例作为对照组。

1.2 试剂与方法

1.2.1 主要试剂 兔抗人 Beclin1 多克隆抗体、兔抗人 LC3 多克隆抗体均购自 Abcam 公司,兔抗人 mTOR 多克隆抗体、通用型免疫组化检测试剂盒、柠檬酸盐缓冲液、DAB 显色试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2.2 免疫组织化学法 所有实验标本均经 4% 甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,以 $5 \mu\text{m}$ 厚连续切片。免疫组化技术采取 SP 法,具体操作严格按试剂盒说明书进行。以 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定 采用双盲法评估免疫组化染色切片,Beclin1、LC3 和 mTOR 均以细胞膜和(或)细胞质染成淡黄色、棕黄色或棕褐色为阳性表达。三者均采用二级计分法,阳性细胞计数:随机任选 5 个高倍镜视野($400 \times$),然后根据每张切片的阳性细胞百分率计数, $< 5\%$ 为 0 分, $5\% \sim < 25\%$ 为 1 分, $25\% \sim < 50\%$ 为 2 分, $\geq 50\%$ 为 3 分。着色强度分类:无着色计 0 分,淡黄色为 1 分,黄或棕黄色为 2 分,褐或棕褐色为 3 分。两者计分相乘 ≥ 4 分为免疫组化阳性(+), < 4 分计为免疫组化阴性(-)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析。两变量之间的相关性分析采用 Spearman 等级分析,计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Beclin1、LC3 和 mTOR 蛋白在肝癌组织和正常肝组织中的表达 Beclin1 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 75% (42/56),在正常肝组织中的阳性表达率为 25% (10/40),两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

LC3 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 70% (39/56),在正常肝组织中的阳性表达率为 30%

(12/40),两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

mTOR 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 50% (28/56),在正常肝组织中的阳性表达率为 28% (11/40),两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 1~3。

表 1 Beclin1、LC3 和 mTOR 在肝癌及正常肝组织中的表达/例(%)

组别	例数	Beclin1	LC3	mTOR
肝癌组织	56	42(75)	39(70)	28(50)
正常肝组织	40	10(25)	12(30)	11(28)
P 值		0.001	0.001	0.027

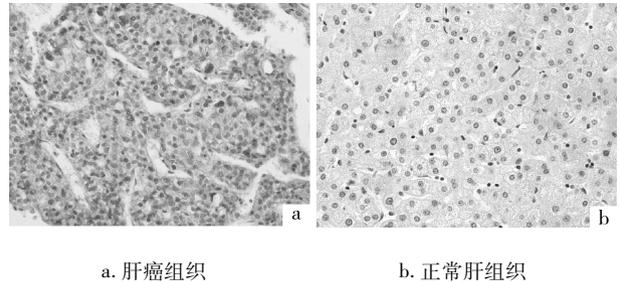


图 1 Beclin1 蛋白在肝癌组织和正常肝组织中的表达($\times 400$)

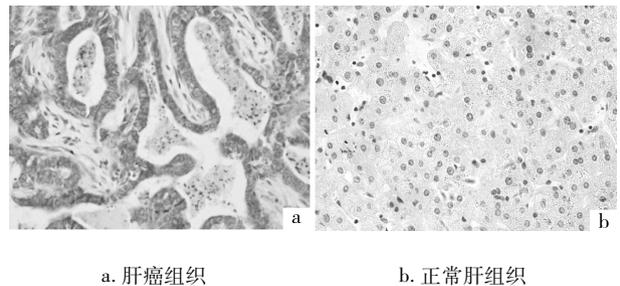


图 2 LC3 在肝癌组织和正常肝组织中的表达($\times 400$)

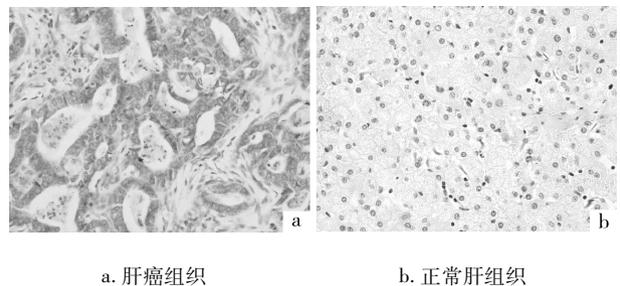


图 3 mTOR 在肝癌组织和正常肝组织中的表达($\times 400$)

2.2 肝癌组织中 Beclin1、LC3 和 mTOR 蛋白表达之间的相关性 Spearman 等级分析结果显示,在肝癌组织中 Beclin1 与 LC3 在肝癌中的表达呈正相关($r = 0.643, P < 0.01$),与 mTOR 表达之间无明显相关性($r = -0.167, P > 0.05$),LC3 与 mTOR 表达呈

负相关($r = -0.386, P < 0.01$)。

2.3 肝癌组织中 Beclin1、LC3 和 mTOR 蛋白表达与临床病理特征之间的关系 Beclin1、LC3 和 mTOR 的表达均与年龄、性别、肿瘤大小、HBSAg、AFP 值等均无显著相关性($P > 0.05$),但与病理学分级和有无胆管癌栓有关($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 Beclin1、LC3 和 mTOR 在肝癌组织中的表达与临床病理参数的关系/例(%)

病理参数	例数	Beclin1	LC3	mTOR
年龄/岁				
<50	20	13(65)	13(65)	8(40)
≥50	36	29(81)	26(67)	20(56)
性别				
男	40	32(80)	30(75)	22(55)
女	16	10(62.5)	9(56)	6(38)
肿瘤大小/cm				
≤5	24	16(67)	14(58)	10(42)
>5	32	26(81)	25(78)	18(56)
HBSAg				
+	38	30(79)	28(74)	21(55)
-	18	12(67)	11(61)	7(39)
AFP/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$				
<400	26	18(69)	16(62)	16(62)
≥400	30	24(80)	23(77)	12(40)
病理学分级				
I ~ II	22	13(59)	11(50)	7(32)
III ~ IV	34	29(85)	28(82)	21(62)
癌栓				
有	11	5(45)	4(36)	2(18)
无	45	37(82)	35(78)	26(58)

3 讨论

肝癌是临床上最常见的恶性消化道肿瘤之一,其发病率和病死率已上升为我国恶性肿瘤的第 2 位,其严重威胁着人类的健康生活。近年来,临床上对于肝癌的治疗方法有很多,例如:手术切除、介入治疗及放、化疗等,但其治疗效果均欠佳,总体 5 年生存率不超过 5%。分析其原因为:由于其恶性程度高,早期症状不明显,病情进展速度快,大多数患者被发现时,已发生远处侵袭和转移^[7]。因此,通过对肝癌发生、发展、侵袭、转移等相关机制的研究,显得尤为迫切。近年来,有研究发现,自噬基因调控机制失调与肿瘤的发生、发展、侵袭、转移等密切相关^[2]。

至今为止,Beclin1 作为唯一被发现的哺乳动物参与自噬的特异性基因^[8],该基因位于人类染色体

17q21 上,大约有 150 kb,编码一个 2 098 bp 的转录产物。有研究显示^[9],在前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中,Beclin1 基因存在缺失性的突变。张创杰^[10]研究发现,Beclin1 在胰腺癌中的表达低于正常胰腺组织。而本实验结果显示,Beclin1 蛋白在肝癌组织(75%,42/56)中的阳性表达率高于正常肝组织(25%,10/40),差异有统计学意义($P < 0.01$)。分析其 Beclin1 在肝癌中高表达的原因,可能是由于肝癌生长迅速,肿瘤细胞需要自噬,以适应营养缺乏和低氧的环境。

LC3 作为参与自噬发生的关键基因,其表达水平与自噬活性关系密切,是监测自噬的特异性标志物^[11]。LC3 包括 LC3-I 和 LC3-II,其中 LC3-II 可通过活化 Atg12,结合 Atg5,从而参与形成自噬体。有研究表明,LC3 的异常表达与许多恶性肿瘤(例如:胃癌、大肠癌、宫颈癌等)的发生、发展及预后关系密切^[12]。Huang 等^[13]报道了 LC3-II 在脑胶质母细胞瘤组织中表达降低,自噬活性下降。但是本实验结果显示,LC3 蛋白在肝癌组织(70%,39/56)中的阳性表达率高于正常肝组织(30%,12/40),差异有统计学意义($P < 0.01$)。上述结果说明,LC3 的表达及作用在不同类型肿瘤中是各不相同的,其在肿瘤发生、发展过程中的作用及其分子机制还有待进一步研究。

哺乳动物 mTOR 作为 PI3K/ AKT 信号传导通路下游的效应靶蛋白,在其信号的传导过程中扮演着重要的角色。当 mTOR 的活性被抑制时,可阻断其下游 S6K1 信号传导通路,使细胞由 G1 向 S 转变所需的相关蛋白缺乏,细胞周期阻滞于 G1 期,进而达到影响细胞周期的进展,调节细胞凋亡的作用。张利等^[14]研究发现,mTOR 在结肠癌组织中的阳性表达率为 78.5%,而在正常结肠组织中的阳性表达率为 12%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。本实验结果显示,mTOR 蛋白在肝癌组织(50%,28/56)中的阳性表达率也高于正常肝组织(28%,11/40),两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。这说明 mTOR 的过度表达与激活可能与肝癌的发生、发展关系密切。

经 Spearman 相关系数检验结果显示,在肝癌组织中 Beclin1 与 LC3 在肝癌中表达呈正相关($r = 0.643, P < 0.01$),与 mTOR 表达之间无明显相关性($r = -0.167, P > 0.05$),LC3 与 mTOR 表达呈负相关($r = -0.386, P < 0.01$)。这说明,三者 in 肝癌发生发展中的关系密切,Beclin1 的高表达可以增强肝癌自噬活性,mTOR 的高表达则会抑制肝癌自噬发

