

• 临床研究 •

Beclin1 在人肝癌组织中的表达及 TGF-β 对肝癌细胞增殖的影响^{*}

杨 威,杨红杰,莫瑞祥,李西融,廖文胜,张慧明,崔凌飞
(广西壮族自治区南溪山医院,广西桂林 541002)

摘 要:**目的** 探讨自噬基因 Beclin1 在原发性肝细胞性肝癌(HCC)中的表达及其临床意义,TGF-β(转化生长因子-β)对肝癌细胞增殖的影响。**方法** 应用免疫组化法检测 HCC 组织及正常肝脏组织中 Beclin1 的表达,分析其与 HCC 临床病理特点的关系;用细胞 MTT 增殖方法检测肝癌细胞增殖的情况。**结果** HCC 组织的 Beclin1 蛋白阳性表达率明显低于正常肝组织($\chi^2=9.47,P<0.05$);Beclin1 的表达与有无门静脉或胆管癌栓、肿瘤病理分级有关($P<0.05$);TGF-β 可抑制肝癌细胞的增殖。**结论** HCC 组织中存在 Beclin1 表达的缺失,可能与 HCC 的发生有密切相关;TGF-β 可抑制肝癌细胞增殖。Beclin1 基因及 TGF-β 对 HCC 的发展及治疗有重要的意义。

关键词:免疫组化; Beclin1; 细胞 MTT 增殖; 转化生长因子-β

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.01.047 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)01-0108-02

Beclin1 是新近克隆的自噬调控基因和正性调节分子,在多种恶性肿瘤组织中可见 Beclin1 的表达下调^[1]。转化生长因子-β(TGF-β)是多肽类细胞因子,在体内、外具有调控细胞外基质蛋白的合成、细胞生长、分化、凋亡等生物学活性^[2]。本研究应用免疫组化法检测肝细胞癌(HCC)中的 Beclin1 表达情况,用细胞 MTT 增殖方法检测肝癌细胞增殖的情况及与 HCC 临床病理特点的相关性,分析其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 1 月至 2014 年 7 月本院行手术切除治疗术的 HCC 患者 50 例,术前均未接受放疗、化疗或免疫治疗,经病理确诊为 HCC 患者,其中女性 11 例,男性 39 例,年龄 26~74 岁,平均(50.7±4.5)岁。HbsAg 阳性者 32 例,占 64.0%;AFP≥400 ug/L 者 27 例,占 54.0%;合并中、重度肝硬化者 46 例,占 92.0%;肝癌肿块位于左肝 12 例,占 24.0%,右肝 33 例,占 66.0%,两侧均见 5 例,占 10.0%;按 Edmondson-steiner 分级标准:I 级 8 例,Ⅱ级 16 例,Ⅲ级 21 例,Ⅳ级 5 例;测量切除后的肿瘤直径大于 5 cm 者 29 例,小于等于 5 cm 者 21 例;有门静脉、胆管癌栓者 18 例,占 36.0%。正常肝组织取自肝外伤手术所切除或其他疾病的肝脏标本,并经病理确诊为正常肝组织。

1.2 方法 采用免疫组化 S-P 法,实验步骤按说明书进行。以已知阳性标本作为阳性对照组,按试剂说明书进行结果判断;Beclin1 阳性表达定位于肝癌细胞质内,呈棕黄色。每张切片在高倍镜下随机选取 10 个视野,根据染色强度和阳性细胞数进行评分,染色强度:1 分,染色弱但明显强于阴性对照;2 分,染色清晰,中等程度;3 分,染色程度强。阳性细胞数:1 分,

阳性细胞占 11%~50%;2 分,阳性细胞占 51%~80%;3 分,阳性细胞不低于 81%。上述两项积分相加,0 分为(-),1~2 分为(+),3~4 分为(++),5~6 分为(+++)。(一)和(+)为阴性,(++)和(+++)为阳性。MTT 法检测细胞的增殖活性。取生长状态良好的第三代人肝癌 Bel7402 细胞,0.25%胰酶消化后,制成单细胞悬液,以 1×10⁴/孔接种于 96 孔板。实验分 3 组:(1)人肝癌 Bel7402 细胞对照组;(2)人肝癌 Bel7402 细胞 TGF-β 给药组(每孔 TGF-β 给药终浓度 1 ng/mL);(3)人肝癌 Bel7402 细胞 TGF-β 抑制剂组(在第 2 组基础上,另加 LY364947 给药终浓度 1 μmol/L)。每组各设 6 个复孔,另设一个空白对照孔。培养 24 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL。在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h。吸弃孔内上清液,每孔加入 150 μL 的二甲基亚砷(DMSO)振荡 15 min,分别测定各孔 OD490 值。

1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 软件作统计学处理,计量资料组间比较用单因素方差分析,计数资料之间的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCC 和正常肝组织中 Beclin 1 的表达比较 Beclin1 阳性表达率在 HCC 组织和正常肝组织中分别为 78.0%(39/50),98.0%(49/50)。Beclin1 在 HCC 组织中的阳性表达率明显低于正常肝组织($P<0.05$)。

2.2 Beclin1 的表达与 HCC 临床病理特征的关系 Beclin1 的表达与年龄、性别、肿瘤大小、HBSAg、AFP、肝硬化程度无关($P>0.05$),而与肿瘤病理分级、有无门静脉或胆管癌栓有关($P<0.05$),见表 1。

表 1 Beclin 1 的表达与 HCC 临床病理特征的关系

临床病理参数	分组	n	Beclin1		阳性率(%)	χ^2	P
			-	+			
年龄(岁)	≤50	32	7	25	78.1	0.11	0.05
	>50	18	4	14	77.8		
性别	女	11	3	8	72.3	0.00	0.05
	男	39	8	31	79.5		

^{*} 基金项目:广西科学研究与技术开发计划项目(1140003A-46)。

续表 1 Beclin 1 的表达与 HCC 临床病理特征的关系

临床病理参数	分组	n	Beclin1		阳性率(%)	χ^2	P
			—	+			
肿瘤大小(mm)	≤50	32	7	25	78.1	0.01	0.05
	>50	18	4	14	77.8		
病理分级	I、II级	24	2	22	91.7	5.02	0.05
	III、IV级	26	9	17	65.4		
AFP(μg/L)	≤400	32	7	25	78.1	0.00	0.05
	>400	18	4	14	77.8		
HBSAg	-	18	4	14	77.8	0.11	0.05
	+	32	7	25	78.1		
癌栓	无	32	3	29	90.6	6.34	0.05
	有	18	8	10	55.6		
肝硬化	轻度	4	1	3	75.0	0.23	0.05
	中重度	46	10	36	78.3		

2.3 TGF-β 对人肝癌 Bel7402 细胞增殖的影响 MTT 法检测 TGF-β 对人肝癌 Bel7402 细胞增殖情况。如表 2 所示, TGF-β 明显降低了 Bel7402 细胞的增殖,而给予 TGF-β 的阻断剂 LY364947 后,使 TGF-β 对 Bel7402 细胞的增殖抑制作用解除。

表 2 MTT 法检测 TGF-β 对人肝癌 Bel7402 细胞增殖的影响

分组	OD490 值($\bar{x}\pm s$,mm)
Bel7402 对照组	0.730±0.037
TGF-β 组	0.618±0.033*
TGF-β+ LY364947 组	0.667±0.035*#

*:P<0.05,与 Bel7402 对照组比较,#:P<0.05,与 TGF-β 组比较。

3 讨 论

Beclin1 基因位于人染色体 17q21,定位于高尔基体,参与 PI3K 复合物的形成和自噬体的组成^[3]。卵巢癌、乳腺癌以及前列腺癌中存在 Beclin1 的缺失性突变^[4]。Beclin1+/-小鼠自发肿瘤形成率远高于野生型小鼠,且发生时间远早于后者,能形成包括淋巴瘤母细胞瘤、B 细胞淋巴瘤、肝细胞癌等多种肿瘤,且其发生率与 Beclin1 表达下降成正相关。表明 Beclin1 缺失导致的细胞自噬能力下降是肿瘤发生的重要原因^[5]。

本研究发现 HCC 组织中 Beclin1 阳性表达率明显低于正常肝组织(P<0.05),提示 Beclin1 表达缺失可能是肝细胞发生恶性转化的原因之一。进一步分析 Beclin1 的表达对 HCC 的临床病理学参数的影响,发现 Beclin1 的表达与有无门静脉或胆管癌栓有关。肿瘤病理分级,表明 Beclin1 的表达缺失与 HCC 的发生、进展等有着密切的关系,Beclin1 的表达缺失可能在 HCC 的恶性增殖浸润、转移过程中有重要作用。

TGF-β 是一种多功能细胞因子,几乎体内的所有细胞都能产生 TGF-β 并存在其受体,在多种肿瘤中可观察到 TGF-β 的高度表达,并且在体内、体外对肿瘤作用。本研究应用 MTT 法检测 TGF-β 对人肝癌 Bel7402 细胞增殖情况,发现 TGF-β 明显降低了 Bel7402 细胞的增殖,而给予 TGF-β 的阻断剂 LY364947 后,使 TGF-β 对 Bel7402 细胞的增殖抑制作用解

除。说明在此浓度下 TGF-β 可抑制肝癌细胞增殖,具有一定临床意义。

TGF-β 在肿瘤发生、发展中与自噬有相似作用。研究表明 TGF-β 在牛乳房 BME-UV1 上皮细胞中诱导自噬过程,TGF-β 是卵巢癌自噬诱导的信号肽^[6],同时有 Beclin1 的表达^[7]。有研究发现 Beclin1、TGF-β 的同时表达可促进细胞的自噬。TGF-β 有可能通过诱导 Beclin1 表达来实现抑制肝癌细胞增殖,尚需要进一步证实。

综上所述,Beclin1 表达缺失与 HCC 的发生、发展有着密切的关系。TGF-β 可以抑制肝癌细胞的增殖。Beclin1 基因及 TGF-β 对研究 HCC 的发病机制及药物开发有重要的意义,可能成为新的基因治疗靶点。

参考文献

[1] Yuan Hong-li,Xue Hui,Li Yong-gang. Beclin1 expression and its clinical significance in the primary cholangiocarcinoma [J]. Learned J North China Coal Med Coll,2011,11(6):792-793.

[2] Bierie B,Moses HL. Tumour microenvironment;TGFβ;the molecular Jekyll and Hyde of cancer[J]. Nat Rev Cancer,2009,6(1):506-20.

[3] 康凯夫,王晓蔚,陈小伍,等. Beclin1 和 NF-κB p65 在肝癌中的表达及其临床意义[J]. 世界华人消化杂志,2010,16(20):2244-2247.

[4] Gajewska M,Gajkowska B,Motyl T. Apoptosis and autophagy induced by TGF-β1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells [J]. J Physiol Pharmacol,2012,56(3):143-57.

[5] 郭晓东,皋月娟,万维,等. 原发性肝细胞癌组织中 Beclin 1 的表达及其意义[J]. 现代生物医学进展,2013,13(1):85-87.

[6] Raffoul F,Campla C,Nanjundan M. et al. SnoN/SkiL,a TGFβeta signaling mediator: A participant in autophagy induced by arsenic trioxide[J]. Autophagy,2010,6(7):141-142.

[7] Smith DM,Patel S,Raffoul F,Haller E,et al. Arsenic trioxide induces a beclin-1-independent autophagic pathway via modulation of SnoN/SkiL expression in ovarian carcinoma cells[J]. Cell Death Differ,2012,28(5):212-213.