

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.36.015

## 自噬调控因子 mTOR 和 Beclin1 在良恶性多形性腺瘤中的表达及意义\*

李磊<sup>1</sup>,李冉<sup>2</sup>,刘江<sup>3</sup>,刘锐<sup>1</sup>,杨国海<sup>4</sup>,张艳波<sup>1△</sup>(1.承德医学院附属医院口腔科,河北承德 067000;2.华北理工大学组织学与胚胎学系,河北唐山 063000;  
3.河北省唐山市工人医院口腔科 063000;4.华北理工大学解剖学系,河北唐山 063000)

**[摘要]** 目的 研究自噬调控中的主要因子西罗莫司靶蛋白(mTOR)及 Beclin1 在良、恶性多形性腺瘤中的表达及意义。方法 采用免疫组织化学显色检测 Beclin1 在 35 例腮腺瘤多形性腺瘤(CPA),37 例腮腺良性多形性腺瘤(PA)和 20 例正常腮腺组织中的表达情况。用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 p-mTOR、Beclin1 在 CPA、PA 及正常腮腺组织中的表达情况。结果 p-mTOR 在正常腮腺组织,PA,CPA 中的阳性表达呈递增的趋势,三者间差异有统计学意义( $P<0.05$ );Beclin1 在 3 种组织中表达呈递减趋势,三者间差异也有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 mTOR 信号因子在 CPA 组织中过度表达,而 Beclin1 在 CPA 组织中的阳性表达受到抑制。

**[关键词]** 自噬;他克莫司结合蛋白质类;Beclin 1;癌在多形性腺瘤**[中图分类号]** R739.87**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)36-5083-03

### Expression and significance of autophagic regulatory factor mTOR and Beclin1 in benign and malignant pleomorphic adenoma\*

Li Lei<sup>1</sup>, Li Ran<sup>2</sup>, Liu Jiang<sup>3</sup>, Liu Rui<sup>1</sup>, Yang Guohai<sup>4</sup>, Zhang Yanbo<sup>1△</sup>(1. Department of Stomatology, Affiliated Stomatology Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China;  
2. Faculty of Histology and Embryology, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 3. Department of Stomatology, Workers' Hospital of Tangshan City, Hebei 067000, China;  
4. Faculty of Anatomy, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the expression and significance of main autophagic regulatory factors of mTOR and Beclin1 in benign and malignant pleomorphic adenoma. **Methods** The expression of Beclin1 in 35 cases of carcinoma in parotid pleomorphic adenoma(CPA), 37 cases of benign pleomorphic adenoma(PA) and 20 cases and normal parotid tissues was measured by adopting the immunohistochemical staining method. The expression of p-mTOR and Beclin1 in CPA, PA and normal parotid tissues was measured by Western blot. **Results** The positive expression of p-mTOR in normal parotid tissue, parotid pleomorphic adenoma and parotid pleomorphic adenoma showed the increasing trend, and the difference among them was statistically significant( $P<0.05$ ). The Beclin1 level in 3 kinds of tissue showed the descending trend, the difference among the three tissues was statistically significant( $P<0.05$ ). **Conclusion** mTOR signal factor is over-expressed in CPA tissue, while the positive expression of Beclin 1 is inhibited in CPA tissue.

**[Key words]** autophagy; tacrolimus binding proteins; Beclin 1; carcinoma in pleomorphic adenoma

多形性腺瘤(pleomorphic adenoma, PA)又名混合瘤,多发生于腮腺,手术切除后常容易复发,生长一段时期后,突然加速生长,多为恶变。目前研究显示,肿瘤的发生常伴随着细胞自噬活性的改变,其调控机制及自噬通路相关蛋白在良、恶性肿瘤,如癌在多形性腺瘤(carcinoma in pleomorphic adenoma, CPA)中的作用尚不清楚,本课题将进一步研究自噬相关因子在良、恶性肿瘤中的作用。

西罗莫司靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)和 Beclin1 都有介导自噬发生的作用,并形成 mTOR-Beclin1 交互调控网络,调节自噬。有研究证明 PI3K-Akt/TSC1/2-mTOR 信号通路在肿瘤的生成生长中起重要作用,在肝癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌等均有报道<sup>[1-2]</sup>。本研究通过对 PI3K/Akt-TSC1/2-mTOR 信号通路相关蛋白磷酸化 mTOR(p-mTOR)及自噬相关蛋白 Beclin1 表达的检测,分析其与腮腺良、恶性肿瘤的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 材料与试剂

所用组织来源于唐山市工人医院和承德附

属医院口腔外科手术病理组织,其中 CPA 组织 35 例,腮腺组织 37 例,正常腮腺组织 20 例。所有手术标本有 2 名医师进行病理验证,且患者术前未进行放疗、化疗等治疗。p-mTOR、Beclin 1 单克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司。

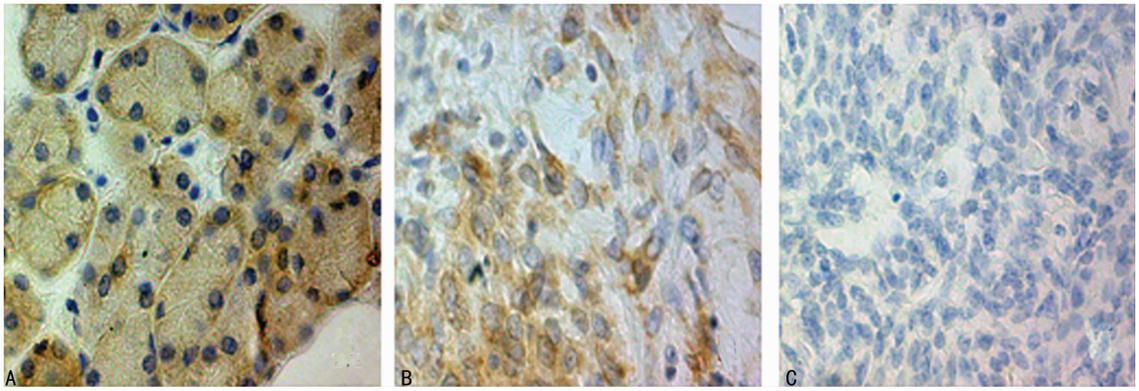
### 1.2 免疫组织化学检测

石蜡切片按常规脱蜡置水,3%过氧化氢孵育 10 min(室温下),清洗后加正常山羊血清于切片封闭,室温孵育 10 min 滴加 1:400 一抗工作液,37℃ 孵育 1~2 h,切片加生物素标记的二抗工作液,室温孵育 15~30 min 后滴加适量辣根过氧化物酶工作液孵育。切片滴加 DAB 显色,组织细胞着棕黄色后终止反应,以苏木素复染、分色,切片脱水透明后封片。阴性对照组不加一抗以 PBS 替代。

### 1.3 Western blot 法定量分析 Beclin1、p-mTOR 表达情况

4℃ 预冷的细胞裂解液裂解保存的组织,冰浴中用匀浆器将组织匀浆,4℃ 30 min 后提取上清液,以微孔酶标仪法进行蛋白定量,样品处理后加样,转膜并加抗靶蛋白的特异性一抗,以牛血清清蛋白(BSA)溶液稀释,其中 Beclin1 稀释比例 1:500, p-mTOR 稀释比例 1:1 000,加针对一抗的碱性磷酸酶偶

\* 基金项目:河北省重点科技研究计划(20130338,20150079);河北省自然科学基金资助项目(H2014105079)。 作者简介:李磊(1978-),副主任医师,硕士,主要从事口腔临床研究。 △ 通信作者, E-mail:13831476354@163.com。



A:正常腮腺;B:PA;C:CPA

图1 Beclin1 在各组织中的表达(免疫组织化学×400)

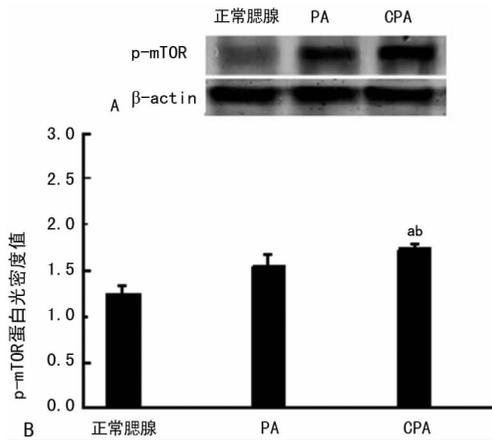
联二抗于室温下孵育,经自动图像分析系统半定量分析实验结果。应用 Image J 医学图像分析系统在同一条件下测定目标条带整合光密度值,计算出各组样品目标条带与内参( $\beta$ -actin)比值大小作为分析对象进行比较。

**1.4 免疫组织化学结果评价** 将细胞质内染色为棕黄色颗粒标记为阳性细胞。由 2 名病理科医师观察 10 个高倍视野,采用双盲法阅片,以每个视野 100 个细胞计数,以阳性细胞率和阳性细胞染色深度进行细胞阳性率评定。阳性细胞率:1 分,阳性细胞数比率占细胞总数小于 10%;2 分,阳性细胞数占细胞总数 10%~50%;3 分,阳性细胞数占细胞总数大于 50%。染色深度:0 分为无染色标记;1 分为淡黄色标记,2 分为黄色标记,3 分为棕黄色标记。2 项评分相乘即为总评分,阴性 0~3 分,阳性 4 分及以上。结果定量:免疫组织化学阳性分析经自动图像分析系统进行半定量。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Beclin1 在正常、PA、CPA 腮腺组织中的表达** Beclin1 在正常、PA、CPA 腮腺组织中的阳性率分别为 100%、89%、56%(图 1),三者间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

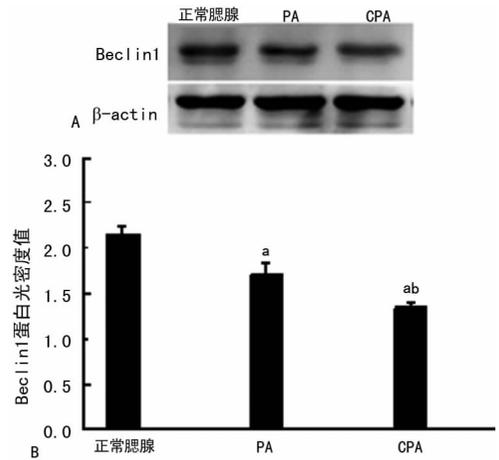


A:Western blot;B:Western blot 分析图;\*: $P < 0.05$  比较,与正常腮腺组织;\*: $P < 0.05$ ,与 PA 组腮腺组织比较

图2 p-mTOR 在正常、PA 和 CPA 腮腺组织中的表达

**2.2 Western blot 法检测 p-mTOR、Beclin1 在各组织中的表达结果** p-mTOR 在 3 种腮腺组织中均有表达,其表达量在正常、PA、CPA 腮腺组织中呈递增趋势,三者之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。Beclin1 在正常、PA、CPA、腮腺组织

中的表达呈递减趋势,三者之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3。



A:Western blot;B:Western blot 分析图;\*: $P < 0.05$ ,与正常腮腺组织比较;\*: $P < 0.05$ ,与 PA 比较

图3 Beclin1 在正常、PA 和 CPA 腮腺组织中的表达

## 3 讨论

自噬是真核细胞特有的生命现象,是亚细胞水平变化的一种进化保守的细胞功能。在多种肿瘤的发生发展过程中都存在细胞自噬及信号转导的改变。本课题组前期研究显示,自噬相关蛋白 LC3 在腮腺 PA 及 CPA 中表达下调,提示自噬功能改变可能在腮腺肿瘤形成中具有一定作用<sup>[3]</sup>。mTOR 和 Beclin1 是自噬调控的重要因子,在 Beclin1 调节自噬的网络功能中 mTOR 细胞信号传导通道的作用及之间存在的相互反馈调控机制的研究也是当今热点问题之一<sup>[4]</sup>。

mTOR 属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶蛋白家族成员,是细胞调节的主要激酶。调控着大量促进细胞周期进程的蛋白质的翻译,异常的 mTOR 活性与大量的人类癌症有着密切的关系。mTOR 在自噬的发生发展过程中起到重要调控作用,是自噬调控通路上的关键位点。mTOR 作为下游信号分子,可以直接被 AKT 激活,也可以通过抑制 TSC 来激活。Johnson 等<sup>[5]</sup>在对直结肠癌的分析研究中显示 p-mTOR 的表达明显高于正常黏膜组织。Guo 等<sup>[6]</sup>对患有肾囊腺瘤的小鼠使用西罗莫司进行治疗,4 周后测量肿瘤体积显著减小,同时发现 mTOR 的表达量下降,这显示 mTOR 在肾囊腺瘤的发展中起到了重要的作用。本试验探讨了 mTOR 信号通路在腮腺 CPA、正常腮腺组织、良性 PA 中的表达情况,发现 p-mTOR 在大部分腮腺 PA 中呈过度表达。p-mTOR 在正常腮腺组织、良性 PA、CPA 中的阳性表达呈递增趋势,差异有统计学意义

( $P < 0.05$ )。提示 mTOR 信号通路在腮腺 CPA 组织中表达异常,可能在腮腺 CPA 的发生、发展中起到了重要的作用。

Beclin1 基因是人们在研究致死 Simbis 病毒性脑炎大鼠过程中,在其中分离出的一个与肿瘤抑制相关的基因<sup>[7]</sup>,Beclin1 蛋白由 4 个结构域构成:卷曲螺旋结构域、BH3、进化保守结构域和核输出结构域<sup>[8]</sup>,通过这些结构域形成复合体定位于自噬体膜上从而介导自噬,诱导细胞凋亡。Beclin1 复合体与含有 BH3 结构域的 Bcl-2 结合后可改变细胞自噬进程,并且 Beclin1 与 Bcl-2 的作用受环境影响较大,当环境养分减少时自噬基因 Beclin1 和 Bcl-2 之间的相互作用显著减少。研究发现在子宫颈癌<sup>[9]</sup>、结肠癌、卵巢癌<sup>[10]</sup>等多种肿瘤中都发现表达异常的 Beclin1 蛋白。本试验用 Western blot 法测定 Beclin1 在 35 例 CPA、37 例 PA 和 20 例正常腮腺组织中的表达情况,结果显示在正常腮腺组织 Beclin1 有较高水平表达,在 PA 中表达较低,在 CPA 中表达最低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示 Beclin1 的表达降低可能与 CPA 的形成及病理进程密切相关,可作为判断恶性多形性腺瘤的预后的辅助指标,同时有望成为其生物治疗的新靶点。

自噬调控因子 mTOR 和 Beclin1 是介导调控自噬的重要因子,在细胞自噬中扮演重要角色,其在肿瘤中的表达异常可能在肿瘤的发生、发展中具有重要意义,其分子学机制还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Huang GM, Jiang QH, Cai C, et al. SCD1 negatively regulates autophagy-induced cell death in human hepatocellular carcinoma through inactivation of the AMPK signaling pathway[J]. *Cancer Lett*, 2015, 358(2):180-190.
- [2] Prasad R, Vaid M, Katiyar SK, et al. Grape proanthocyanidin inhibit pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo through induction of apoptosis and by targeting the

PI3K/Akt pathway[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e43064.

- [3] 李冉,李磊,刘江,等. 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[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(13):1293-1295.
- [4] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4):571-580.
- [5] Johnson SM, Gulhati P, Rampy BA, et al. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer [J]. *J Am Coll Surg*, 2010, 210(5):767-778.
- [6] Guo Y, Kwiatkowski DJ. Equivalent benefit of rapamycin and a potent m TOR ATP-competitive inhibitor, MLN0128(INK128), in a mouse model of tuberous sclerosis[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(5):467-473.
- [7] Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin1: a unique autophagy-related protein [J]. *Cell Res*, 2007, 17(10):839-849.
- [8] Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y. Crystal structure of the Bcl-XL Beclin 1 peptide complex; Beclin-1 is a novel BH3 only protein[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(17):13123-13132.
- [9] Cheng HY, Zhang YN, Wu QL, et al. Expression of beclin 1, an autophagy-related protein, in human cervical carcinoma and its clinical significance [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2012, 33(1):15-20.
- [10] Miracco C, Cosci E, Oliveri G, et al. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin-1 in human brain tumours [J]. *Int J Col*, 2007, 30(2):429-436.

(收稿日期:2017-08-09 修回日期:2017-09-11)

(上接第 5082 页)

的数据,下一步争取多中心、随机研究加以证实。

#### 参考文献

- [1] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012 [J]. *Intensive Care Med*, 2013, 39(2):165-228.
- [2] Duan C, Li T, Liu L. Efficacy of limited fluid resuscitation in patients with hemorrhagic shock: a meta-analysis [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7):11645-11656.
- [3] 刘大为. 实用重症医学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2010:405-406.
- [4] Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition [J]. *JAMA*, 2012, 307(23):2526.
- [5] Malbrain ML, Marik PE, Witters I, et al. Fluid overload, de-resuscitation, and outcomes in critically ill or injured patients: a systematic review with suggestions for clinical practice [J]. *Anaesthesiol Intensive Ther*, 2014, 46(5):361-380.
- [6] Trof RJ, Beishuizen A, Cornet AD, et al. Volume-limited

versus pressure-limited hemodynamic management in septic and nonseptic shock [J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(4):1177-1185.

- [7] Dushianthan A, Grocott MP, Postle AD, et al. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury [J]. *Postgrad Med J*, 2011, 87(1031):612-622.
- [8] 梁道业, 马春林. 脓毒性休克患者血管外肺水及炎症因子水平的动态变化 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(17):3679-3681.
- [9] Karapetsa M, Pitsika M, Goutzourelas N, et al. Oxidative status in ICU patients with septic shock [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 61(12):106-111.
- [10] O'Mahony DS, Glavan BJ, Holden TD, et al. Inflammation and immune-related candidate gene associations with acute lung injury susceptibility and severity: a validation study [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):1104-1112.
- [11] Caser EB, Zandonade E, Pereira E, et al. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: prospective evaluation of 7,133 patients [J]. *Crit Care Med*, 2014, 42(3):574-582.

(收稿日期:2017-08-08 修回日期:2017-09-10)