

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.014

· 临床研究 ·

Beclin1 在非小细胞肺癌的表达及其与 EGFR 突变的关系

孙雪丽, 苗欣, 赵家义, 韩一平(第二军医大学附属长海医院呼吸与危重症医学科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 观察 Beclin1 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达情况,探讨其与 EGFR 突变的相关性。**方法:** 分别采用 DNA 直接测序法、免疫组化法检测 42 例 NSCLC 患者 EGFR 突变情况及 Beclin1 表达情况,分析二者之间关系及临床意义。**结果:** 与癌旁组织比较,NSCLC 组织中 Beclin1 高表达(71.4% vs 30.9%, $P < 0.01$),Beclin1 的表达与吸烟史、病理类型有关($P = 0.005$, $P = 0.025$)。EGFR 突变 14 例,其中高表达 Beclin1 11 例,低表达 Beclin1 2 例,突变率为 57.9% (11/19) vs 16.7% (2/12), Beclin1 的表达与 EGFR 突变具有显著正相关性($r = 0.416$, $P = 0.009$)。**结论:** NSCLC 患者 EGFR 突变与 Beclin1 的表达具有正相关性,Beclin1 表达情况在一定程度上有助于判断 NSCLC 的 EGFR 突变状况,可能为判断 EGFR 突变提供有意义的线索。

[关键词] 非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体(EGFR)突变; Beclin1

[中图分类号] R734.2; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)03-0378-04

Expression of Beclin1 in non-small cell lung cancer and its relationship with EGFR mutation

SUN Xueli, MIAO Xin, ZHAO Jiayi, HAN Yiping (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of Beclin1 in the tissues of non-small cell lung cancer (NSCLC) and to investigate its correlation with EGFR mutation. **Methods:** Immunohistochemistry and DNA sequencing were used to detect the expression of Beclin1 and EGFR mutation in 42 patients with NSCLC, respectively. The clinical significance and their correlations were analyzed. **Results:** The expression levels of Beclin1 were significantly higher in NSCLC tissues than that in the para-carcinoma normal tissues (71.4% vs 30.9%, $P < 0.01$). The expression of Beclin1 in NSCLC was associated with smoking history and histological type ($P = 0.005$, $P = 0.025$). There were 14 cases with EGFR mutation, among which 11 cases expressed high level of Beclin1 and 2 cases expressed low level of Beclin1, with a mutation rate of 57.9% (11/19) vs 16.7% (2/12). EGFR mutation and the expression of Beclin1 had a significant correlation ($r = 0.416$, $P = 0.009$). **Conclusion:** EGFR mutation in NSCLC patients was positively correlated with Beclin1 expression. Beclin1 could help to determine EGFR mutation in NSCLC patients at certain level, and could provide a meaningful evidence to determine EGFR mutation.

[Key words] non-small cell lung cancer(NSCLC); EGFR mutation; Beclin1

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(3): 378-381. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.014]

肺癌发生率及死亡率居恶性肿瘤之首,每年全球约 159 万人死亡^[1]。其中以非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)最常见(约占 85%)^[2]。表皮生长因子受体(EGFR)突变是 NSCLC 的重要驱动基因,同时也是 NSCLC 靶向治疗的具有筛选性和预测性的生物学靶点。近十余年,随着靶向治疗药物 EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)的应用及深入研究,使得具有 EGFR 突变的 NSCLC 患者的无进展生存率及总生存率显著

[基金项目] 上海市科委计划项目(No. 15411960400)。Project supported by Shanghai Science Committee (No. 15411960400)

[作者简介] 孙雪丽(1990-),女,江苏省宿迁市人,硕士,主要从事肺癌早期诊治研究,E-mail: sxl130122@163.com

[通信作者] 韩一平(HAN Yiping, corresponding author),E-mail: yphan2006@163.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160428.1656.008.html>

延长^[3]。Beclin1 作为自噬关键因子之一,其功能失活促进肿瘤的发生^[4]。活化的 EGFR(EGFR 突变或 EGFR 受 EGF 刺激)可通过与 Beclin1 直接作用,使得 Beclin1 酪氨酸磷酸化调节自噬,且 EGFR-TKI 可抑制 EGFR 突变的 NSCLC 细胞中 Beclin1 的磷酸化,进而诱导自噬发挥抑制肿瘤细胞生长作用^[5]。因此,本研究主要探讨 Beclin1 在 NSCLC 中的表达及其临床意义,以及 Beclin1 表达与 EGFR 突变的关系,旨在探研是否可通过检测 Beclin1 的表达来预测 EGFR 突变情况。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2013 年 6 月至 2014 年 6 月第二军医大学附属长海医院手术切除的 42 例 NSCLC 标本及相应癌旁组织。详细记录 NSCLC 患者临床资料包括性别、年龄、吸烟史、TNM 分期、肿瘤分化程度、肿瘤直径、是否淋巴结转移等情况。入选标准:(1)就诊于第二军医大学附属长海医院的初诊患者;(2)所有患者手术切除标本经病理诊断为非小细胞肺癌;(3)临床数据完整。排除标准:(1)术前接受过放、化疗等治疗;(2)排除其他恶性肿瘤等。获取组织标本前均向患者或家属告知详情并签署知情同意书,NSCLC 组织标本用于实验研究及相应的研究方案上报医院伦理委员会并获得批准。患者的一般临床资料详见表 1。

1.2 免疫组化法检测 NSCLC 组织 Beclin1 的表达

对收集的 42 例 NSCLC 组织标本应用 4% 甲醛溶液固定、常规石蜡包埋及切片;取一定量 pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液,加入微波盒中,脱蜡、水化;封闭后,加一抗 Beclin1(1:200, Abcam, USA),4℃ 过夜,加二抗 37℃ 孵育 30 min(兔二抗,CST,USA),DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,封片。

评判标准:由两位病理科医生进行。Beclin1 主要表达于 NSCLC 细胞胞质中,为黄色或棕褐色颗粒。免疫组化评估结果根据细胞染色强度及阳性细胞比例评判。评分标准:(1)细胞染色强度评分:无染色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;(2)按阳性细胞比例评分:<10% 为 0 分,11%~30% 为 1 分,31%~50% 为 2 分,>50% 为 3 分。将两者结果相加。免疫组化结果分级:1~2 分为低表达,3~4 分为中等程度表达,5~6 分为高表达;同时将所得结果 >2 分判为阳性。

1.3 DNA 直接测序法检测 EGFR 突变

DNA 直接测序法:首先进行 DNA 提取,接着进

表 1 Beclin1 表达与 NSCLC 临床特征之间关系(n)

Tab. 1 Correlation of Beclin 1 expression with clinical parameters in 42 NSCLC patients(n)

Characteristic	N	Beclin1 expression		χ^2	P
		Negative	Positive		
Gender				0.805	0.370
Male	29	10	19		
Female	13	2	11		
Ages(years)				0.834	0.361
<60	22	9	13		
≥ 60	20	11	9		
Smoking history				9.086	0.005
0	24	4	20		
1-399	2	1	1		
≥ 400	16	10	6		
Histology				5.050	0.025
AD	22	3	19		
SQ	20	9	11		
Differentiation				4.968	0.069
Poor	17	3	14		
Moderate to well	23	7	16		
Well	2	2	0		
TNM stage				0.518	1.000
I	15	4	11		
II	20	6	14		
III	3	0	3		
IV	4	1	3		
Tumor size(cm)				1.112	0.292
≤ 5	31	7	24		
>5	11	5	6		
Lymph node metastasis				0.000	1.000
No	25	7	18		
Yes	17	5	12		

行引物设计(引物序列如下: Exon 18 forward primer: 5'-TCCAAATGAGCTGGCAAGTG-3', Reverse primer: 5'-TCCCAAACACTCAGTCAAAC-3'; Exon 19 forward primer: 5'-GTGCATCGCTGGTAACATCC-3', Reverse primer: 5'-TCTGGAGATGAGGGTCT-3';

Exon 20 forward primer: 5'-CCGCCTGCTGGGCATCTG-3', Reverse primer: 5'-GCGATCTGCACACACAGTTGAG-3'; Exon 21 forward primer: 5'-GCTCAGAGCCTGGCATGAAC-3'; Reverse primer: 5'-CATCCTCCCCTGCATTT-3')。进而通过 PCR 法特异性扩增 *EGFR* 突变基因的第 18、19、20 和 21 四个基因片段。PCR 反应条件第一步变性 95 °C 5 min, 第二步退火 65 °C 30 s, 第三步延伸 72 °C 1 min, 循环 35 次。通过 Sequence Analysis 5.0 软件分析测序图谱, 判断外显子突变位点。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 进行统计学分析, 采用非参数检验、 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法以及 Pearson 相关性分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Beclin1 在 NSCLC 癌组织中高表达

免疫组化检测 NSCLC 癌组织中 Beclin1 高表达 19 例, 中等表达 11 例, 低表达或不表达 12 例, 阳性表达率为 71.4% (30/42); 癌旁组织中高表达 7 例, 中等表达 6 例, 低表达或不表达 29 例, 其阳性表达率为 30.9% (13/42), 结果表明癌组织 Beclin1 较癌旁组织高表达 ($P = 0.000$)。

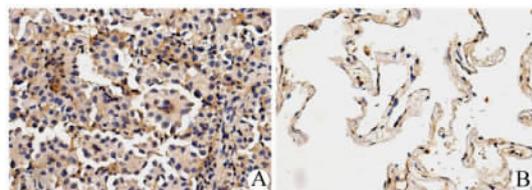


图 1 免疫组化法检测 Beclin1 的表达 ($\times 40$)

Fig.1 The expression of Beclin1 proteins in NSCLC tissues by immunohistochemical staining ($\times 40$)

A: Cancer tissues; B: Surrounding tissues

2.2 Beclin1 蛋白表达与临床特征的关系

表 1 结果显示 Beclin1 阳性率与吸烟史以及病理类型具有显著相关性 ($P = 0.005, P = 0.025$)。不吸烟患者的阳性率高于大量吸烟者 (83.3% vs 37.5%, $P < 0.01$); 腺癌标本中 Beclin1 阳性表达率高于鳞癌 [86.4% (19/22) vs 55% (11/20), $P < 0.05$]; 女性 Beclin1 阳性率高于男性 (84.6% vs 58.6%), 但二者之间差异无统计学意义 ($P = 0.271$)。Beclin1 表达与患者年龄、TNM 分期、肿瘤直径、淋巴结转移等比较, 差异无统计学意义

(均 $P > 0.05$)。

2.3 Beclin1 表达与 *EGFR* 突变关系

DNA 直接测序法检测 42 例 NSCLC 标本中, *EGFR* 突变 14 例 (33.33%), 其中腺癌 12 例, 鳞癌 2 例。其中 21 外显子突变 8 例, 19 外显子突变 6 例。42 例 NSCLC 标本中, Beclin1 低表达 12 例, 中等程度表达 11 例, 高表达 19 例。Beclin1 低表达组 *EGFR* 突变 2 例; 中等程度表达组 *EGFR* 突变 1 例; 高表达组 *EGFR* 突变 11 例; 相对应的突变率分别为 16.7%、9.1% 和 57.9%。 χ^2 检验及 Pearson 相关分析显示 Beclin1 表达与 *EGFR* 突变具有正相关性 ($r = 8.984, P = 0.012; r = 0.416, P = 0.009$)。

3 讨论

针对 *EGFR* 突变的靶向治疗对具有 *EGFR* 突变阳性的 NSCLC 患者疗效显著。随着 *EGFR* 通路的作用机制研究的不断深入, 研究^[5]发现, 活化 *EGFR* (*EGFR* 突变) 使得 Beclin1 酪氨酸磷酸化调节自噬, 且 *EGFR*-TKI 可抑制 *EGFR* 突变的 NSCLC 细胞中 Beclin1 的磷酸化, 进而诱导自噬发挥抑制肿瘤细胞生长作用。本研究探讨了 Beclin1 在癌组织中的表达情况以及其与 *EGFR* 突变之间的关系。

Beclin1 基因是哺乳动物参与自噬的特异性基因, 为自噬相关基因 6 (autophagy related gene 6, Atg6) 的哺乳动物的直系同源物。Beclin1 的功能失调促进肿瘤发生, Beclin1^{+/-} 小鼠患自发性肿瘤, 如肺癌、肝癌等^[6-7]。此外, 既往研究结果提示, Beclin1 在结肠癌、宫颈癌高表达, 在黑素瘤和肺癌组织 Beclin1 低表达^[8-11]。本研究结果与上述结果相悖, 癌组织中 Beclin1 表达率显著高于癌旁组织 ($P = 0.000$), 这提示 Beclin1 在肿瘤细胞增殖中发挥着重要作用, 此结果与既往细胞学研究相一致^[12], 此结果仍需大样本量的数据进行验证。

本文进一步进行 Beclin1 阳性表达率与年龄、性别、吸烟史和 TNM 分期等临床因素相关分析, 发现 Beclin1 的表达情况与患者的吸烟史、病理类型有统计学意义。本研究中, Beclin1 的表达阳性率在非吸烟患者中显著高于大量吸烟者 (83.3% vs 37.5%, $P = 0.005$); 腺癌标本中 Beclin1 阳性表达率高于鳞癌标本 (86.4% vs 55%, $P = 0.025$), 这与相关研究结果^[13]一致。而 Beclin1 与性别、年龄、肿瘤直径、TNM 分期和淋巴结转移等差异无统计学意义。女性患者中 Beclin1 表达率高于男性患者 (84.6% vs 58.6%), 但二者差异无统计学意义。

既往研究^[14]表明, *EGFR* 通过下游信号 PI3K/

AKT/mTOR 调节自噬。有学者^[15]发现 AKT 可引起 Beclin1 磷酸化调节自噬。Wei 等^[5]发现存在基因突变的 EGFR 可直接与 Beclin1 作用, 导致 Beclin1 的磷酸化, 抑制自噬。本研究主要探讨 Beclin1 表达与 EGFR 突变的关系, 结果显示 Beclin1 表达与 EGFR 突变具有正相关性 ($P = 0.012$), 这可能与基因突变活化的 EGFR 直接与 Beclin1 作用, 形成 EGFR/Beclin1 复合物相关^[5], 明确的机制仍需进一步进行细胞学研究。因此, Beclin1 低表达情况有助于预测 EGFR 突变状态, 表明其对预测预后具有重要意义。进一步统计分析显示 Beclin1 表达情况与 EGFR 不同突变位点无统计学意义 ($P > 0.05$)。EGFR 突变在腺癌患者中为 12 例, 鳞癌患者为 2 例, 突变主要发生在腺癌患者, 这与既往研究结果一致^[16], 2 例鳞癌患者 EGFR 突变可能标本中含有腺癌成分有关。既往研究发现 EGFR 基因突变更多见于女性、非吸烟者, 本研究发现 Beclin1 在非吸烟患者高表达, 这与 EGFR 突变在非吸烟者中多见规律相符。因此女性、不吸烟 NSCLC 患者结合 Beclin1 表达情况, 可能进一步提高 EGFR 突变的预测, 具有临床决策意义。

总之, 本研究发现自噬相关蛋白 Beclin1 在肺癌组织中表达失调, 其表达情况与患者的吸烟史、病理类型相关。此外, 本研究首次提出 Beclin1 表达情况与 EGFR 突变具有统计学意义, Beclin1 低表达的 NSCLC 患者 EGFR 突变率低, 这可能有助于判断 EGFR 突变情况。这一结果仍需大样本量的数据进行验证。

[参考文献]

- [1] TAN C S, GILLIGAN D, PACEY S. Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(9): e447-459. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00246-6.
- [2] HERBST R S, HEYMACH J V, LIPPMAN S M. Lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(13): 1367-1380. DOI: 10.1056/NEJMr0802714.
- [3] VINCENTEN J, SMIT E F, VOS W, et al. Negative NKX2-1 (TTF-1) as temporary surrogate marker for treatment selection during EGFR-mutation analysis in patients with non-small-cell lung cancer. [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 10(7): 1522-1527. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182635a91.
- [4] LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182635a91.
- [5] WEI Y J, ZOU Z J, BECKER N, et al. EGFR-mediated phosphorylation of Beclin 1 in autophagy suppression, tumor progression and tumor chemoresistance [J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1269-1284. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.015.
- [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. DOI: 10.1172/JCI200320039.
- [7] YE Z, JIN S, YANG C, et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(25): 15077-15082. DOI: 10.1073/pnas.2436255100.
- [8] HU Y F, LEI X, ZHANG H Y, et al. Expressions and clinical significance of autophagy-related markers Beclin1, LC3, and EGFR in human cervical squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Targets Ther*, 2015, 8: 2243-2249. DOI: 10.2147/OTT.S86844.
- [9] WU S H, SUN C B, TIAN D, et al. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4): 3882-3891.
- [10] TINI P, BELMONTE G, TOSCANO M, et al. Combine epidermal growth factor receptor and Beclin1 autophagic protein expression analysis identifies different clinical presentations, responses to chemo- and radiotherapy, and prognosis in glioblastoma [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 208076. DOI: 10.1155/2015/208076.
- [11] JIANG Z F, SHAO L J, WANG W M, et al. Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 9: 259-267. DOI: 10.1007/s11033-011-0734-1.
- [12] 任爽, 秦艳茹, 张岩, 等. 自噬相关基因 Beclin1 沉默对人肺癌 A549 细胞顺铂耐药性的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(10): 2809-2810.
- [13] JIANG L L, LIANG X, LIU M, et al. Reduced expression of liver kinase B1 and Beclin1 is associated with the poor survival of patients with non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5): 1931-1938. DOI: 10.3892/or.2014.3432.
- [14] BOTTI J, DJAVAHERI-MERGNY M, PILATTE Y, et al. Autophagy signaling and the cogwheels of cancer [J]. *Autophagy*, 2006, 2(2): 67-73. DOI: 10.4161/auto.2.2.2458.
- [15] WANG R C, WEI Y, AN Z, et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin1 phosphorylation [J]. *Science*, 2012, 338(6109): 956-959. DOI: 10.1126/science.1225967.
- [16] SUN P L, SEOL H, LEE H J, et al. High incidence of EGFR mutations in Korean men smokers with no intratumoral heterogeneity of lung adenocarcinomas: correlation with histologic subtypes, EGFR/TTF-1 expressions, and clinical features [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(2): 323-330. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182381515.

[收稿日期] 2016-02-01

[修回日期] 2016-04-15

[本文编辑] 党瑞山