

# Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在肝癌中的表达及其临床意义

康凯夫, 王晓蔚, 陈小伍, 石祥呈

## ■背景资料

肝细胞性肝癌是一种常见恶性肿瘤,在我国居恶性肿瘤发病率的第三位,死亡率的第二位,因此寻找敏感而特异的肿瘤标志物对肝癌的早期发现,早期诊断,早期治疗至关重要。

康凯夫, 王晓蔚, 陈小伍, 石祥呈, 南方医科大学附属顺德第一人民医院病理科 广东省顺德市 528300

康凯夫, 硕士, 硕士生导师, 主任医师, 主要从事肿瘤病理诊断及分子生物学研究。

通讯作者: 康凯夫, 528300, 广东省顺德市, 南方医科大学附属顺德第一人民医院病理科. gentleman-kang@163.com

电话: 0757-22318570

收稿日期: 2008-03-26 修回日期: 2008-04-19

接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-07-18

## Expression and clinical significance of Beclin1 and NF- $\kappa$ B p65 protein in primary human hepatocellular carcinoma

Kai-Fu Kang, Xiao-Wei Wang, Xiao-Wu Chen, Xiang-Cheng Shi

Kai-Fu Kang, Xiao-Wei Wang, Xiao-Wu Chen, Xiang-Cheng Shi, Department of Pathology, the First People's Hospital of Shunde Affiliated to Southern Medical University, Shunde 528300, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Kai-Fu Kang, Department of Pathology, the First People's Hospital of Shunde Affiliated to Southern Medical University, Shunde 528300, Guangdong Province, China. gentleman-kang@163.com

Received: 2008-03-26 Revised: 2008-04-19

Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-07-18

## Abstract

**AIM:** To explore the expression and clinic significance of Beclin1 and Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B p65) protein in primary human hepatocellular carcinoma (HCC).

**METHODS:** Fifty pathologically-confirmed HCC samples, 30 post-hepatitis cirrhosis samples, 30 hepatitis tissue samples and 10 normal hepatic tissue samples from January 2003 to December 2007 were collected. The expressions of Beclin1 and NF- $\kappa$ B p65 in liver tissues were detected using immunohistochemistry.

**RESULTS:** The expressions rates of Beclin1 protein in cancer tissues, cirrhosis tissues, hepatitis tissues, normal tissues were respectively 78.00% (39/50), 26.67% (8/30), 53.3% (16/30) and 10.00% (1/10). The differences among the four were statistically significant ( $\chi^2 = 28.31$ ,

$P < 0.05$ ). The expressions of Beclin1 protein was significantly higher in HCC tissues than in cirrhosis tissues, hepatitis tissues or normal tissues ( $\chi^2 = 20.39$ ,  $\chi^2 = 5.31$ ,  $\chi^2 = 14.41$ ,  $P < 0.05$ ). The expressions of Beclin1 protein was markedly higher in hepatitis tissues than in cirrhosis tissues and normal tissues ( $\chi^2 = 4.44$ ,  $\chi^2 = 4.12$ ,  $P < 0.05$ ). The expressions rates of NF- $\kappa$ B p65 protein in HCC tissues, cirrhosis tissues, hepatitis tissues and normal hepatic tissues were 74.00% (37/50), 36.67% (11/30), 30.0% (9/30) and 20.00% (2/10), respectively. The differences among the four were statistically significant ( $\chi^2 = 22.00$ ,  $P < 0.05$ ). The expression of NF- $\kappa$ B p65 protein was markedly higher in HCC tissues than in cirrhosis tissues, hepatitis tissues and normal hepatic tissues ( $\chi^2 = 10.89$ ,  $\chi^2 = 14.85$ ,  $\chi^2 = 8.44$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Beclin1 expression is positively correlated with NF- $\kappa$ B p65 expression in HCC. Aberrant expressions of Beclin1 and NF- $\kappa$ B p65 are closely related with HCC development. They may play important roles in HCC development.

**Key Words:** Beclin1; Nuclear factor-kappa B; Immunohistochemistry

Kang KF, Wang XW, Chen XW, Shi XC. Expression and clinical significance of Beclin1 and NF- $\kappa$ B p65 protein in primary human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2244-2247

## 摘要

**目的:** 分析自噬基因Beclin1和核因子NF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B)在原发性肝细胞性肝癌(primary human hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达及其临床意义。

**方法:** 收集顺德第一人民医院2003-01/2007-12手术切除经病理学证实的HCC50例, 肝炎后肝硬化手术切除或活检标本30例, 肝炎患者肝脏穿刺组织30例和正常肝组织10例。应用免疫组化S-P法检测肝脏组织中Beclin1和NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达。

**结果:** 原发性肝细胞性肝癌、肝硬化、肝

## ■同行评议者

王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

炎和正常肝组织的Beclin1蛋白阳性表达率分别是78.00%(39/50)、26.67%(8/30)、53.33%(16/30)、10.00%(1/10), 四者之间的差异有统计学意义( $\chi^2 = 28.31, P < 0.05$ ), 且Beclin1在原发性肝细胞性肝癌组织表达明显高于在肝硬化组织, 肝炎组织, 正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 20.39, 5.31, 14.41, P < 0.05$ ); 在肝炎组织表达明显高于在肝硬化组织, 正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 4.44, \chi^2 = 4.12, P < 0.05$ ). 原发性肝细胞性肝癌、肝硬化、肝炎和正常肝组织的NF- $\kappa$ B p65蛋白阳性表达率分别是74.00%(37/50)、36.67%(11/30)、30.00%(9/30)、20.00%(2/10), 四者之间的差异有统计学意义( $\chi^2 = 22.00, P < 0.05$ ), 且NF- $\kappa$ B p65在原发性肝细胞性肝癌组织表达明显高于在肝硬化组织, 肝炎组织, 正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 10.89, \chi^2 = 14.85, \chi^2 = 8.44, P < 0.05$ ).

**结论:** Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在HCC中的表达关系密切, 呈正相关; Beclin1和NF- $\kappa$ B p65异常表达与HCC的发展密切相关, 在HCC的发展过程中起重要的作用。

**关键词:** Beclin1; 核因子 $\kappa$ B; 免疫组化

康凯夫, 王晓蔚, 陈小伍, 石祥呈. Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在肝癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2244-2247

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2244.asp>

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见恶性肿瘤. 在我国恶性肿瘤发病率居第3位, 死亡率第2位. 有关肝癌的发病机制仍不完全清楚, 目前认为, 多基因、多阶段的癌基因或抑癌基因变异构成肝癌发生和发展的分子基础. Beclin1基因也称BECN1基因. 是一种分子质量为60 kU的蛋白质, 位于人染色体17q21, 与*bcl-2*基因产物相互作用能抑制Sinbis病毒的复制, 减少中枢神经系统的凋亡<sup>[1-2]</sup>. 核因子NF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B)作为一种具有多向转录调节作用的核蛋白因子, 是在1986年由Rwiansen和Baltimo发现的. 当时认为NF- $\kappa$ B只在成熟的B细胞中特异表达<sup>[3]</sup>. 随后的研究发现, NF- $\kappa$ B广泛存在于各种组织细胞中, 但在不同类型和不同生存状态的组织细胞中, 其活性有所不同<sup>[4]</sup>. 迄今的研究显示NF- $\kappa$ B在多种原发肿瘤中高表达, 在恶性肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用. 本研究旨在用免疫组化的方法来检测Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在肝癌中的表

达情况, 并探讨其临床意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集顺德第一人民医院2003-01/2007-12手术切除经病理学证实的HCC 50例, 按Edmondson分级标准I-II级24例, III-IV级26例. 其中男性47例, 女性3例, 年龄28-71(平均56.5)岁. 收集肝炎后肝硬化手术切除或活检标本30例, 其中男性22例, 女性8例, 年龄25-69(平均50.6)岁. 收集肝脏患者肝脏穿刺组织30例, 按1995年中国病毒性肝炎防治方案(试行)慢性肝炎分级分期标准, 轻, 中, 重度各10例. 其中男性28例, 女性2例, 年龄6-51(平均34.8)岁. 标本用40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 4  $\mu$ m厚连续切片. 用意外死亡(生前体健)经HE染色切片诊断证实无病变的成人肝脏标本作正常对照. 兔多抗Beclin1, 鼠单抗NF- $\kappa$ B p65购自美国Santa Crus公司.

**1.2 方法** 应用免疫组化S-P法, 实验步骤按说明书进行. 以试剂公司提供的阳性对照片作为阳性对照, 以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照. 用双盲法对染色结果进行评估, Beclin1蛋白和NF- $\kappa$ B p65主要表达于细胞质, 呈棕黄色, 背景不着色. 每例随机观察5个高倍视野( $\times 400$ ), 每高倍视野计数200个瘤细胞. 计数细胞总数及核阳性细胞数, 按阳性细胞所占的百分比计分: 阳性细胞率 $\leq 20\%$ 为1分, 阳性细胞率 $> 20\%$ 且 $\leq 50\%$ 为2分, 阳性细胞率 $> 50\%$ 且 $\leq 75\%$ 为3分, 阳性细胞率 $> 75\%$ 为4分; 同时, 将染色强度分为4级: 阴性染色1分, 弱染色2分, 中等强度染色3分, 强染色4分; 根据二者的乘积判断结果,  $\leq 4$ 分为(-);  $> 4$ 且 $\leq 8$ 为(+);  $> 8$ 且 $\leq 12$ 为(++);  $> 12$ 且 $\leq 16$ 为(+++).

**统计学处理** 用SPSS13.0统计软件对数据采用卡方检验、四格表概率法及相关分析进行统计学分析处理. 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 Beclin1蛋白的表达** Beclin1蛋白主要表达于细胞质, 呈棕黄色, 弥漫分布(图1). HCC、肝硬化, 慢性肝炎和正常肝组织的Beclin1蛋白阳性表达率分别是78.00%(39/50)、26.67%(8/30)、53.33%(16/30)、10.00%(1/10), 四者之间的差异有统计学意义( $\chi^2 = 28.31, P < 0.05$ ), 经两两比较, Beclin1在原发性肝细胞性肝癌组织表达明显高于在肝硬化组织, 肝炎组织, 正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 20.39, \chi^2 = 5.31, \chi^2 = 14.41, P < 0.05$ ); 在肝炎组织表达明显高于在肝硬化组织, 正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 4.44, \chi^2 = 4.12, P < 0.05$ , 表1).

### ■ 研发前沿

自噬对肿瘤具有双向作用, 因而NF- $\kappa$ B p56是否通过自噬发挥作用尚需进一步研究证实.

## ■相关报道

国内外对Beclin1在肝癌发生中的作用研究得出的结论尚不统一,本文对50例原发性肝细胞肝癌中Beclin1和NF- $\kappa$ B p56的表达进行了细致的研究,发现两者在肝癌中均高表达,与Djavaheri-Mergny *et al*报道的NF- $\kappa$ B p56激活抑制了肿瘤坏死因子介导的自噬结果不完全一致。

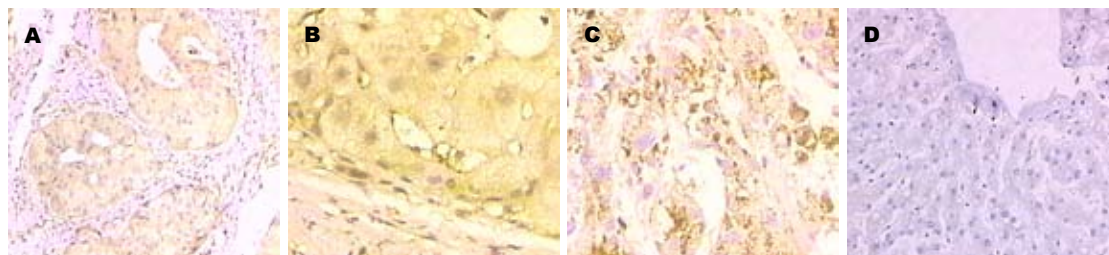


图1 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在不同肝组织中的表达(SP  $\times$  400). A: Beclin1在肝癌组织中的表达; B: Beclin1在肝炎组织中的表达; C: NF- $\kappa$ B p65在肝癌组织的表达; D: NF- $\kappa$ B p65在正常肝组织的表达。

表1 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65蛋白在各组肝组织中表达情况

	Beclin1				NF- $\kappa$ B p65			
	阴性		阳性		阴性		阳性	
正常肝组织	10	9	1	10.00	8	2	20.00	
慢性肝炎	30	14	16	53.33	20	9	30.00	
肝硬化	30	22	8	26.67	19	11	36.67	
HCC	50	11	39	78.00	13	37	74.00	

表2 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65表达与肝细胞性肝癌临床病理参数的关系

	<i>n</i>	Beclin1		NF- $\kappa$ B p65	
		阴性	阳性	阴性	阳性
年龄(岁)					
≥60	16	4	12	3	13
<60	34	7	27	10	24
肿瘤大小(cm)					
≤5	19	8	11	9	10
>5	31	3	28	4	27
Edmondson分级					
I / II	24	3	21	2	12
III / IV	26	8	18	11	25
HBsAg					
阳性	42	7	35	12	30
阴性	8	4	4	1	7
转移					
阳性	14	3	11	2	12
阴性	36	8	28	11	25

2.2 NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达 NF- $\kappa$ B p65蛋白在癌组织中以胞质型为主,部分肝癌组织可见胞核表达,阳性细胞的分布呈弥漫性、小巢状或散在分布(图1); NF- $\kappa$ B p65蛋白阳性表达率分别是74.00%(37/50)、36.67%(11/30)、30.00%(9/30)、20.00%(2/10),四者之间的差异有统计学意义( $\chi^2 = 22.00, P < 0.05$ ),经两两比较, NF- $\kappa$ B p65在原发性肝细胞性肝癌组织表达明显高于在肝硬化组织,肝炎组织,正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 10.89$ ,

表3 50例肝细胞性肝癌组织Beclin1和NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的关系

	<i>n</i>	NF- $\kappa$ B p65			
		-	+	++	+++
-	11	4	1	4	2
+	9	2	3	4	0
++	26	7	10	7	2
+++	4	0	0	3	1
合计	50	13	14	18	5

$\chi^2 = 14.85, \chi^2 = 8.44, P < 0.05$ , 表1)。

2.3 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在肝癌组织的表达与相关临床病理因素的关系 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在HCC中的表达与年龄、性别、组织学分级、HBsAg及转移均无关,而与肿瘤的大小有关(表2)。在50例肝细胞性肝癌组织中, Beclin1和NF- $\kappa$ B p65表达强度之间存在正相关( $r = 0.794, P < 0.05$ , 表3)。

### 3 讨论

Beclin1基因也称BECN1基因,位于人染色体17q21,定位于高尔基体,参与PI3K复合物的组成和自噬体的形成<sup>[5]</sup>。据报道75%卵巢癌、50%乳腺癌以及40%前列腺癌中存在BECN1基因的缺失性突变<sup>[2]</sup>。在动物实验中观察到二乙基亚硝胺诱导的原发性肝癌和癌前结节自噬能力较正常肝细胞下降<sup>[6]</sup>。因而通常被认为是一种肿瘤抑制基因,但本研究结果显示Beclin1在肝癌组织和肝炎组织中高表达的特性,将在基因水平上为肝癌的预防和治疗提供一个新的靶点。Beclin1蛋

白表达与年龄、组织学分级、HBsAg及转移均无关, 与肿瘤直径大小有关, 有统计学意义. 该实验结果对我们进一步研究Beclin1在肝细胞性肝癌中的作用有重要意义, 有助于肝癌的诊断和治疗方案的选择.

核因子NF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B)是信号传导途径的中枢的关键转录刺激因子,  $\kappa$ B位点存在于多种细胞和病毒的基因组中, 因而NF- $\kappa$ B能够调控众多基因转录<sup>[7]</sup>其信号转导途径参与了肝脏免疫炎症反应相关基因、肝炎病毒相关基因和原癌基因和抑癌基因的转录表达<sup>[8]</sup>. 在肝癌组织中异常激活, 可抑制细胞凋亡, 促进肝细胞存活, 与肝癌的发生发展密切相关<sup>[9]</sup>. 本研究亦显示NF- $\kappa$ B p65在原发性肝细胞性肝癌组织表达明显高于在肝硬化组织, 肝炎组织, 正常肝组织中的表达, 与年龄、组织学分级、HBsAg及转移均无关, 与肿瘤直径大小有关, 有统计学意义. 这提示在HCC中表达具有特异性, 这将为HCC的治疗提供新的靶点.

在分析Beclin1与NF- $\kappa$ B p65的关系时发现, Beclin1与NF- $\kappa$ B p65在肝癌的发展过程中呈明显的正相关( $r = 0.794$ ,  $P < 0.05$ ). 推测二者可能在肝细胞性肝癌的发生发展中共同发挥着重要作用, 但具体调控机制尚不清楚. 推测其可能机制有下述几个方面: (1)当细胞受到各种因素(如氧化、缺血/再灌注、TNF2 $\alpha$ 、钙超载、毒性化合物)刺激下, 线粒体渗透性转运通道(MTP)开放, 线粒体肿胀, 释放cyc-c等凋亡因子. 此时, 细胞启动自噬来清除受损线粒体, 避免凋亡因子释放进入胞质, 同时提高细胞对低氧的耐受力, 对细胞起到一定保护作用. 这些外界信号同时激活了NF- $\kappa$ B信号通路, 使得Beclin1与NF- $\kappa$ B p65表达均增高. (2)Beclin1与NF- $\kappa$ B p65两者可能与凋亡相互拮抗: Liang *et al*证明Beclin1通过与**bcl-2**相互作用, 在宿主中枢神经系统抗Sindbis病毒感染发病机制中起作用, 推测Beclin1与**bcl-2**家族的凋亡作用有关<sup>[1]</sup>, 因为**bcl-2**基因上有 $\kappa$ B位点, 参与NF- $\kappa$ B激活后的抗细胞凋亡过程, 当肿瘤发展至晚期, 若自噬仍未活化, 则肿瘤细胞对缺血、缺氧的耐受力下降, 且不能及时清除胞内受损大分子物质和细胞器, 肿瘤细胞可能最终走向凋亡或坏死. 而自噬活化过程中因大分子物质循环和有害物质的隔离使肿瘤细胞生存. 进而保护肿瘤细胞免于凋亡和坏死的危险. 肿

瘤细胞所具有的高自噬活性对肿瘤细胞在恶劣环境中的生存起到一定的保护作用. (3)共同作用于c-Myc, ras等癌基因促进肿瘤生长. (4)肿瘤细胞的生长因子是受NF- $\kappa$ B调节的靶基因, 可以激活NF- $\kappa$ B信号通路<sup>[10]</sup>, 而生长因子结合于跨膜酪氨酸受体后, 激活1型磷脂酰肌醇三磷酸激酶(class I P13K), 使PIP被磷酸化为PIP3, PIP3结合于Akt/PKB和他的活化分子PDK1. 抑制了mTOR激酶活性, 促进自噬形成<sup>[11]</sup>. (5)均在肝脏枯否细胞有表达, 可能均参与了从肝炎, 肝硬化到肝癌的免疫炎症反应.

迄今, 研究提示自噬信号通路与NF- $\kappa$ B p65信号转导通路之间可能通过某些交叉点共同在恶性肿瘤的发生、发展中发挥作用. 但其具体机制尚不清楚. 深入研究Beclin1, NF- $\kappa$ B p65两者之间的关系对阐明肝癌的发生、发展并最终开发新的治疗手段提供理论依据.

#### 4 参考文献

- 1 Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 1998; 72: 8586-8596
- 2 Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999; 59: 59-65
- 3 Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921-928
- 4 史艳晖, 卢圣栋. 转录因子NF- $\kappa$ B的研究现状及其应用前景. *中国生物工程杂志* 2007; 27: 110-114
- 5 Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2001; 2: 330-335
- 6 温莹浩, 殷正丰. 自噬与肿瘤. *实用肿瘤杂志* 2006; 21: 482-485
- 7 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩. 核转录因子Rel/NF- $\kappa$ B与乙型肝炎病毒. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 145-148
- 8 Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; 431: 461-466
- 9 姚登福, 苏小琴. 核因子- $\kappa$ B异常激活与肝炎病毒感染关系的研究进展. *中国实用内科杂志* 2006; 23: 1862-1864
- 10 王文举, 李鸿钧, 孙茂盛. NF- $\kappa$ B与持久炎症及肿瘤发生关系. *生命的化学* 2007; 27: 197-199
- 11 Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Souquere S, Pierron G, Codogno P. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem* 2006; 281: 30373-30382

#### ■同行评价

本文内容全面, 具有一定的实用性, 科学性和先进性.

编辑 李军亮 电编 郭海丽