

自噬基因 Beclin 1 与肿瘤的关系

汤建文¹, 刘 强²综述, 张阳根^{1△}审核

(1. 解放军第 175 医院检验科, 福建漳州 363000; 2. 解放军第 62 医院检验科, 云南普洱 665000)

关键词: 自噬; Beclin 1; 脑胶质瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)04-0458-03

自噬是一种在进化上保守, 亚细胞水平的自我吞噬, 形成自噬溶酶体, 降解泡内的细胞质及细胞器, 释放氨基酸和游离脂肪酸, 从而实现细胞的自身代谢和细胞器更新, 以适应环境、维持稳态的过程。自噬活性的改变、自噬信号通路和转运途径的负向调控与多种肿瘤的发生、发展密切相关, 自噬基因的异常表达能够启动或抑制某些肿瘤的形成。Beclin 1 基因是近十多年来发现的与自噬相关的一种抑癌基因, 主要通过诱导自噬、促进凋亡而抑制肿瘤的发生发展, 在多种肿瘤中发现 Beclin 1 基因表达异常。现对自噬基因 Beclin 1 的结构、功能及与肿瘤的关系, 尤其是与神经胶质细胞瘤的关系综述如下。

1 Beclin 1 的研究历史

有文献报道, 染色体 17q21 等位基因在卵巢癌患者中缺失率高达 75%^[1], 在乳腺癌患者中缺失率为 50%^[2], 在前列腺癌患者中缺失率也有 40%^[3]。1998 年, Liang 等^[4]在大鼠辛德毕斯病毒性脑炎模型中发现一种相对分子质量为 60×10^3 , 螺旋结构的蛋白质, 能与肌动蛋白 bcl-2 相互作用后, 抑制病毒的复制同时诱导病毒的凋亡, 并将编码此蛋白质的基因命名为 Beclin 1。1999 年, Aita^[5]等学者就发现在乳腺癌细胞中 Beclin 1 是缺失的, Beclin 1 基因存在于人染色体 17q21, 并成功克隆 Beclin 1 基因。2003 年 Klionsky 等^[6]以酵母的自噬基因为标准, 以“autophagy”中的 Atg 命名, 统一了自噬相关基因及其对应蛋白的命名。Beclin 1 与酵母自噬基因 Atg6 同源。此后越来越多学者开始关注 Beclin 1 基因, 越来越多的证据表明 Beclin 1 基因与自噬、凋亡及肿瘤的形成存在联系。Beclin 1 基因是第一个在哺乳动物中发现与自噬相关的抑癌基因^[7]。

2 Beclin 1 及相关配体的基因和蛋白

2.1 Beclin 1 基因和蛋白的结构与功能

Beclin 1 定位于人染色体 17q21, 450 个氨基酸序列, 广泛存在于人类正常组织, 其编码蛋白相对分子质量大小为 60×10^3 , 三维结构为卷曲螺旋。Beclin 1 蛋白结构域分三部分: BH3 区域、进化保守区 (ECD) 以及中央卷曲螺旋区 (CCD)^[8]。Maiuri 等^[9]发现: BH3 区域与 Bcl-2 蛋白结合介导参与自噬作用, 而无法与突变的 Bcl-xl 相互结合介导自噬发生。Oberstein 等^[8]证明并完善了这一理论: BH3 区域在参与自噬的同时, 与 Bcl 蛋白家族抗凋亡成员 Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w 结合, 破坏了肿瘤细胞抗凋亡能力。ECD 区是 Beclin 1 与肿瘤细胞 Vps34 结合的位点, 启动自噬功能以及抑制肿瘤。Liang 等^[10]在结肠癌 HCT116 细胞中发现, Beclin1 的 CCD 区与紫外线辐射抵抗的相关蛋白 (UVRAG) 的中央 CCD 区结合, 最终促进自噬膜的形成并抑制肿瘤发展。

2.2 Beclin 1 相关配体的结构和功能

2.2.1 配体蛋白 UVRAG 的结构和功能

UVRAG 基因定位于人类染色体 11q13^[11]。Liang 等^[125]发现 UVRAG 蛋白与 Beclin 1 蛋白结合, 通过激活 Beclin 1 及其下游信号发挥肿瘤

抑制作用, 而 UVRAG 基因突变将阻碍 Beclin 1 与其结合, 影响自噬体的形成和自噬过程的启动, 增加肿瘤发生的可能性。研究得到 UVRAG 蛋白功能域由 4 部分组成: (1) 脯氨酸富含区 (PR), 位于第 1~41 残基; (2) 钙依赖性脂类结合区域 (C2), 位于第 42~147 残基; (3) 蛋白卷曲域 (CCD 区), 位于第 200~269 残基; (4) 蛋白羧基端区域 (C 端), 位于第 270~699 残基^[13]。UVRAG 蛋白 PR 区与 Endophilin B1 (Bif-1) 结合后, 可通过蛋白相互作用, 再与 Beclin1-PI3K3 形成复合物: Beclin1-UVRAG-PI3K3, 后者介导自噬双层膜结构的弯曲, 形成自噬体膜^[14]。Matsunaga 等^[15]证明 Beclin1-UVRAG-PI3K 3 复合物主要作用于自噬体和内涵体成熟阶段, 能正向调节细胞内容物的转运; 蛋白卷曲域结合位点是 Beclin 1 的 CCD 区结合位点, 前面已经说明; 钙依赖性脂类结合区域决定了 UVRAG 结合脂膜层的能力, 而对于蛋白羧基端区域结合位的研究, liang 等当用 siRNA 下调 C/Vps 复合物时, 发现细胞自噬下调程度改变的很小, 认为 C/Vps 只发挥很小的作用。而 Cheng Yu^[16]却得到相反的结论, 他们的实验结果支持 UVRAG-C/Vps 在促进自噬形成中发挥重要作用。

2.2.2 配体蛋白 Rubicon 的结构和功能

Rubicon 由 972 个氨基酸构成, Rubicon 的高表达能降低微管相关蛋白轻链 3 (microtubule associated protein lightchain 3, LC3) 与囊泡结合的亲和性, 进而抑制自噬的启动^[17]。研究发现 Rubicon 由 4 个功能域组成: (1) RUN 区; (2) 卷曲螺旋区 CCD; (3) 富含半胱氨酸的区域。通过实验发现, Rubicon 的 RUN 区在肿瘤 HEK293T 细胞中通过降低 Vps34 脂类激酶的活性, 抑制 PI3KC3 参与的复合物活性 (前文已说明), 最终发挥活性的复合物 Beclin1-UVRAG-Rubicon-PI3KC3, 负向调控细胞自噬的活化。Sun 等^[18]的研究证实了这一点, 并发现当 RUN 区域发生突变, 自噬作用不能正常进行, 认为 Rubicon 的 RUN 区在下调 PI3KC3 活性和自噬中发挥重要作用。Yun^[19]是基于人的基因研究, 认为 Rubicon 卷曲螺旋区 CCD 的功能是与 Beclin 1 的 CCD 相结合, 富含半胱氨酸的区域可能是抑制人 Rubicon 结合 Beclin 1 和 Vps34。

2.2.3 配体蛋白 Atg14 的结构和功能

Matsunaga 等^[15]发现了 Beclin 1 的另一种结合蛋白 Atg14。人类 Atg14 蛋白由 492 个氨基酸组成, 包含 1 个卷曲螺旋区域, 位于自噬溶酶体膜上, 主要介导 Beclin 1 与 PI3KC3 结合, 结合蛋白 Atg14 是自噬体形成的必需蛋白, Atg14 与 Beclin 1 的相互作用能够诱导自噬体双膜结构的形成, 这是自噬最先开始也是很重要的步骤^[20]。有意思的是, 当通过 miRNA 干扰沉默 Beclin 1, Atg14 表达随之降低, 说明 Beclin 1 对维持 Atg14 表达水平的稳定、防止其降解具有重要作用。研究者最近发现 Barkor/ Atg14 (L) 是 Beclin1-UVRAG-PI3KC3 介导的自噬体膜定位的靶点^[21]。

3 Beclin1 蛋白与配体蛋白之间的关系

3.1 Beclin1 蛋白与配体可形成的复合物 综上所述, Beclin1 蛋白在发挥活性时与配体形成 3 类复合物: Beclin1-UVRAG-PI3KC3; Beclin1-UVRAG-Rubicon- PI3KC3; Beclin 1-Atg14-PI3KC3。

3.2 Beclin 1、Rubicon、Atg14L 的关系 Beclin 1(CCD)的卷曲螺旋结构域的功能是绑定结合 Atg14L 的 CCD 结构, Beclin 1 的进化上的保守结构域(ECD)可以约束人的 Rubicon 配体蛋白, Atg14L 的 CCD 有效结合的 Beclin 1 和 Vps34, 人 Rubicon 的 CCD 结合 Beclin 1 和 Vps34, 同时人 Rubicon 的 RUN 或富含半胱氨酸的区域可能是抑制人 Rubicon 去结合 Beclin 1 和 Vps34。

4 Beclin 1 与肿瘤的关系

4.1 Beclin 1 诱导肿瘤细胞自噬性死亡 在自噬过程中, 如果过多的细胞器或者蛋白质被降解, 细胞的功能就会严重受损, 出现不可逆的改变, 最终导致细胞死亡, 所以在营养缺乏等应激条件下更易出现自噬性死亡, 前文得出, Beclin 1 蛋白及配体复合物参与自噬膜位点的确定及自噬膜的形成, 诱导肿瘤细胞自噬性死亡。

4.2 Beclin 1 诱导肿瘤细胞凋亡 细胞凋亡是活体内单个细胞或小团细胞的一种主动死亡方式, 是受细胞内基因及细胞外一些因子调控的生物学过程, 以 DNA 早期降解为特征, 细胞最终分解成凋亡小体后被巨噬细胞或组织吞噬。前文我们提到的, 有研究报道认为, 自噬可诱发凋亡性细胞死亡, 诱导肿瘤细胞凋亡。

4.3 Beclin 1 抑制肿瘤细胞增殖 有文献报道在过度表达 Beclin 1 的乳腺癌 MCF27 细胞中, 细胞增殖、克隆形成及体内成瘤受到抑制。而过度表达 Beclin 1 的结肠癌^[22]、子宫颈癌^[23]细胞同样也出现了细胞周期的停滞以及增殖的抑制。Beclin 1 抑制肿瘤细胞增殖的具体机制还有待研究。

4.4 Beclin 1 抑制肿瘤坏死及炎症扩散 Degenhardt 等^[24]构建了 Beclin 1+/2 同时高表达抗凋亡基因 Bcl-2 的永生化小鼠肾上皮细胞(iBMK)。由于同时抑制了凋亡及自噬, 代谢应激能导致该细胞大量的坏死。而野生型 Beclin 1+/+ 同时高表达 Bcl22 的细胞则能显著抵抗代谢应激反应。电镜显示 Beclin 1+/+Bcl22 细胞浓缩但是形态正常, 而 Beclin 1+/2Bcl22 细胞则出现了大量的空泡及坏死样结构。两种细胞种植到小鼠体内, Beclin 1+/2Bcl22 细胞成瘤速度明显快于 Beclin 1+/+ Bcl22 细胞, 并伴随瘤组织中央大量的坏死及炎性反应。因此, Beclin 1 介导的自噬作用是预防肿瘤坏死及炎性反应, 抑制肿瘤形成的重要手段。

5 Beclin 1 预防细胞基因组突变

自噬可以降解陈旧或受损蛋白及细胞器, 是维持细胞内稳态的机制。自噬可限制 DNA 损伤, 维持基因组完整性。在永生化小鼠肾上皮细胞中, 自噬活性降低可导致细胞 DNA 损伤、基因扩增、染色体非整倍性等, 这种基因组的不稳定增加了致癌性突变率, 促进了肿瘤的发生。多种肿瘤的发生都与细胞基因突变有一定的联系, 如白血病等。Beclin 1 预防细胞基因突变, 在一定程度上可以降低癌变率, 这种理论能和细胞自体吞噬的抗衰老功能联系起来, 随着人体衰老以及细胞自体吞噬的基本水平下降, DNA 损伤增多, 癌症的发病率会增加。因此, 有学者认为 Beclin 1 作为肿瘤抑制基因并不完全因为其缺失导致了细胞死亡的削弱, Beclin 1 的抑制作用可能与其介导的自噬作用, 预防细胞基因组突变^[25]。Mat hew^[26]和 Karantza 在 Beclin 1 + / - 永生化小鼠乳腺上皮细胞(iMMEC)的研究

中也证明了这一理论。

6 Beclin 1 与神经胶质瘤的关系

近来不断有证据表明, Beclin1 存在于神经胶质瘤细胞中, 且与肿瘤细胞发展存在密切关系。Xin 等^[27]证实了胶质瘤分期为Ⅲ级和Ⅳ级的胶质细胞瘤中 Beclin 1 蛋白的表达量低于Ⅰ级和Ⅱ级, 进一步发现了, 由于微管相关蛋白轻链 3B(LC3B)和 Beclin1 的表达下降, 导致胶质细胞瘤发展进程中自噬能力的下降。Kong 等^[28]在 62 例临床患者中, 使用免疫组化和蛋白表达分析发现, 抑制 Beclin 1 蛋白的表达可以降低神经胶质细胞瘤 U251 的自噬水平, 同时增加细胞程序性坏死。CD133+ 的胶质瘤干细胞对莫替唑啉(TMZ)的耐药性体现在抵抗对 TMZ 介导的自噬作用, FU 等^[29]使用 RT-PCR 分别检测到在对 TMZ 耐药的胶质瘤干细胞的自噬相关基因(Beclin-1, LC3 and Atg5)的表达量, Western blotting 检测他们相应蛋白的表达量, 结果发现与 CD133- 的对照组相, 无论是 m-RNA 还是蛋白水平, Beclin-1, LC3 and Atg5 都显著下降。

7 展望

适度的自噬有利于细胞存活, 但过度自噬则可导致Ⅱ型程序性细胞死亡。Beclin 1 是自噬活化的关键基因, 目前已经是公认的一种抑癌基因, 许多肿瘤都存在 Beclin 1 的表达异常, Beclin 1 表达水平的高低与肿瘤发生发展、增殖分化和恶性程度有着密切联系。有关 Beclin 1 与脑胶质瘤关系的研究至今报道甚少, 但是随着对其研究的深入, 它与脑胶质瘤的关系将逐渐明朗化。相信在不久的将来, 以 Beclin 1 基因为靶点的脑胶质瘤的治疗有望成为又一新的治疗领域, 将受到越来越多的关注。

参考文献

- [1] Cliby W, Ritland S, Hartmann L, et al. Human epithelial ovarian cancer allelotyping[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(10 Suppl): 2393-2398.
- [2] Futreal PA, Soderkvist P, Marks JR, et al. Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(9): 2624-2627.
- [3] Gao X, Zacharek A, Salkowski A, et al. Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(5): 1002-1005.
- [4] Liang XH, Kleeman LK, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol*[J]. Nov, 1998, 72(11): 8586-8596.
- [5] Aita VM, Liang XH, Murty VV, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21[J]. *Genomics*, 1999, 59(1): 59-65.
- [6] Klionsky DJ, Gregg JM, Dunn WA, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes[J]. *Dev Cell*, 2003, 5(4): 539-545.
- [7] Tsuchihara K, Fujii S, Esumi H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues[J]. *Cancer Lett*, 2009, 278(2): 130-138.
- [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] Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin21[J]. *EMBO J*, 2007, 26(10): 2527-2539.
- [10] Liang C, Feng P, Ku B, et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(7): 688-699.

- [11] Itakura E, Kishi C, Inoue KJ, et al. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG[J]. *Mol Bio Cell*, 2008, 19(12):5360-5372.
- [12] Liang CY, Jung JU. Autophagy genes as tumor suppressors[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 22(1):1-8.
- [13] Liang C, Sir D, Lee S, et al. Beyond autophagy: the role of UVRAG in membrane trafficking[J]. *Autophagy*, 2008, 4(6):817-820.
- [14] Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy antumorigenesis[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(10):1142-1151.
- [15] Matsunaga K, Noda T, Yoshimori T. Binding Rubicon to cross the Rubicon[J]. *Autophagy*, 2009, 5(6):876-877.
- [16] Chengyu Liang, Donna Sir, et al. Beyond autophagy: The role of UVRAG in membrane trafficking[J]. *Autophagy*, 2008, 4(6):817-820.
- [17] Zhong Y, Wang QJ, Yue ZY. Atg14L and Rubicon: yin and yang of Beclin 1-mediated autophagy control[J]. *Autophagy*, 2009, 5(6):890-891.
- [18] Sun Q, Zhang J, et al. The RUN domain of rubicon is important for hVps34 binding, lipid kinase inhibition, and autophagy suppression[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(1):185-191.
- [19] Yun Zhong, Qing Jun Wang, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol 3-kinase complex[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(4):468-476.
- [20] Zhong Y, Wang QJ, et al. Atg14L and Rubicon: yin and yang of Beclin 1-mediated autophagy control[J]. *Autophagy*, 2009, 5(6):890-891.
- [21] Fan W, Nassiri A, Zhong Q. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor /At- g14(L)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(19):7769-7774.
- [22] Koneri K, Goi T, Hirono Y, et al. Beclin 1 gene inhibits tumor growth in colon cancer cell lines[J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(3B):1453-1457.
- [23] Wang ZH, Xu L, Duan ZL, et al. Beclin 12mediated macroautophagy involves regulation of caspase29 expression in cervical cancer HeLa cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 107(1):107-113.
- [24] Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(1):51-64.
- [25] Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(13):1621-1635.
- [26] Mathew R, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability[J]. *Genes Dev*, 2007, 21:1367-1381.
- [27] Huang X, Bai HM, Chen L, et al. Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors[J]. *J Clin Neurosci*, 2010, 17(12):1515-1519.
- [28] Kong XX, Zhang HY, Chen ZQ, et al. Inhibition of Beclin 1 enhances apoptosis by H₂O₂ in glioma U251 cells[J]. *J Sheng Li Xue Bao*, 2011, 63(3):238-244.
- [29] FU Jun, LIU Zhi-gang. Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced Autophagy[J]. *Chinese Medical Journal*, 2009, 122(11):1255-1259.

(收稿日期:2012-10-16)

• 综 述 •

粪便潜血检测方法学的研究进展

罗俭权 综述, 潘彩英 审校

(广东省四会市人民医院检验科 526200)

关键词:粪便潜血试验; 消化道出血; 分析方法与原理

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)04-0460-02

粪便潜血试验(FOBT)是临床诊断多种疾病引起的消化道出血的一项重要常规检查,对胃癌和结肠癌等消化道肿瘤,持续的消化道出血可能是其早期出现的唯一特征,FOBT对早期监测方法最有帮助^[1-3]。为解决FOBT的特异性问题及鉴别消化道出血部位,国内外临床实验室不断探索和改进多种检测方法,现就各种方法学的应用原理和优缺点研究进展予以概述。

1 化学法

化学法的反应原理是利用血红蛋白含亚铁血红素具有过氧化物酶活性,催化过氧化氢释放出新生态氧,使试剂色原显色,从颜色深浅也可以判断出血程度定量。根据试剂色原分为还原酚酞法、联苯胺法、邻甲苯胺法、无色孔雀绿法、愈创木酯法、匹拉米洞法。目前国内外生产应用四甲基基础联苯胺和愈创木酯为显色基质的潜血试带,替代具有致癌性的联苯胺法,增加安全性和敏感度^[4]。

2 免疫法

免疫学方法以其抗原抗体反应原理的特异性和灵敏度,是当前发展最快也最有临床实用价值的潜血实验方法。免疫学

方法有三类抗体可用于粪便的潜血实验:一种为抗人血红蛋白抗体,一种抗人红细胞基质抗体,另一种为抗血液中其他成分如 α 1-AT、Tf、Hb-Hp等^[5]。

2.1 血红蛋白胶体金标检测法 是检测抗人血红蛋白抗体,利用血液中Hb的亚铁血红素特异性结合人Hb抗原,最常用的单克隆抗体胶体金标检测法^[6]。大多数厂家研发推出单克隆抗体一步法试验,如三明治夹心免疫检验法,操作简便,适合临床广泛应用。据Herzog和Cameron等研究,正常人24h胃肠道生理性失血量为0.6mL,若每日在于2mL,则属于病理性出血。由于血红蛋白胶体金标检测法的高度敏感性,可造成假阳性,血红蛋白胶体金标检测法是主要检测下消化道出血的优点,目前被大多研究者^[7-8]认为是对大肠癌普查最适用的试验,约有40%~50%的上消化道出血不能检出。原因是:(1)血红蛋白或红细胞经过消化酶降解变性或消化耗尽已不具有原来免疫原性;(2)过量出血而致反应体系中抗原过剩出现前带现象;(3)患者血红蛋白的抗原与单克隆抗体不配。因此笔者从临床经验分析认为,出现外观为柏油样便的结果阴性或