

胃癌组织中 FoxO1、MAPLC3、Beclin1 的表达及临床意义

Expression and Clinical Significance of FoxO1, MAPLC3 and Beclin1 in Gastric Cancer

LIU Feng-rui, YAO Ming, TANG Ning

刘丰瑞¹, 姚明², 汤宁¹

(1. 南京市鼓楼医院, 江苏南京 210000; 2. 宿迁市人民医院, 江苏宿迁 223800)

摘要: [目的] 检测胃癌组织中叉头转录因子 O 亚家族 1 (FoxO1)、微观相关蛋白轻链 3 (MAPLC3) 和自噬相关基因 Beclin1 的表达情况, 并探究其临床意义。[方法] 胃腺癌患者手术切除的胃癌组织 95 例、癌旁组织 49 例, 采用免疫组化实验检测组织样本中 FoxO1、MAPLC3、Beclin1 蛋白表达情况; 分析胃癌组织中 FoxO1、MAPLC3、Beclin1 蛋白表达变化与患者临床病理参数的关系, 并进行相关性分析。[结果] 免疫组化结果显示, 胃癌组织中 FoxO1、MAPLC3、Beclin1 蛋白的阳性表达率分别为 31.58% (30/95)、44.21% (42/95)、40.00% (38/95), 均低于癌旁组织, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。胃癌组织中, FoxO1 蛋白表达与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有关 (均 $P < 0.05$); MAPLC3 和 Beclin1 蛋白表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期有关 (均 $P < 0.05$), 三者共表达阳性率与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有关 (均 $P < 0.05$)。Spearman 相关检验结果显示, 胃癌组织中, FoxO1 水平与 MAPLC3 水平呈正相关 ($r = 0.345, P = 0.017$), FoxO1 水平与 Beclin1 水平呈正相关 ($r = 0.385, P < 0.001$), 且 MAPLC3 水平与 Beclin1 水平呈正相关 ($r = 0.604, P < 0.001$)。[结论] 胃癌组织中, FoxO1、MAPLC3、Beclin1 蛋白表达均降低, 且均与患者较差临床病理参数有关。FoxO1、MAPLC3、Beclin1 对胃癌患者的诊断和病情进展评估具有一定价值。

关键词: 胃肿瘤; FoxO1; MAPLC3; Beclin1; 临床病理参数; 相关性

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2020)02-0159-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.02.B016

叉头转录因子 O 亚家族 1 (FoxO1) 作为 PI3K/Akt 信号通路的直接下游分子, 参与调节细胞增殖、凋亡以及代谢等生理病理过程^[1]。FoxO1 是具有潜在抗肿瘤血管生成、侵袭转移的抑癌基因, 研究表明, FoxO1 参与调节自噬的多个环节, 具有自噬活性因子的作用^[2]。自噬是真核细胞特有的生命现象, 是细胞在恶劣环境中的一种程序性细胞死亡, 自噬异常与肿瘤发生进展有关, 是目前肿瘤研究领域的新热点^[3]。自噬相关基因是自噬过程的关键调节因子, 其中微观相关蛋白轻链 3 (MAPLC3) 和自噬相关基因 Beclin1 在肿瘤细胞自噬过程中发挥重要作用, 是自噬体的特异性标记蛋白^[4]。胃癌是常见的消化道恶性肿瘤, 近年来的发病率和死亡率呈增加趋势^[5], 越来越多的研究证实, 自噬在胃癌发生发展过程中扮演重要角色, 是近年来的研究热点^[6]。本研究采用免疫组织化学实验检测胃癌组织中 FoxO1、MAPLC3 和 Beclin1 蛋白表达, 分析其表达与患者临床病理参数的关系, 并探究其表达之间的相关性, 以为胃癌的病情评估及治疗提供新思路, 现报道如下。

通信作者: 刘丰瑞, 住院医师, 学士; 南京市鼓楼医院普外科, 江苏省南京市中山路 321 号 (210000); E-mail: 640926555@qq.com
收稿日期: 2019-05-24; **修回日期:** 2019-07-17

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2016 年 6 月至 2018 年 12 月, 入住我院的胃腺癌患者手术切除的胃癌组织 95 例、癌旁组织 49 例, 纳入标准: 具备完整的病例资料; 术后经病理诊断证实为胃腺癌; 术前未接受放疗、靶向治疗等; 排除标准: 合并其他恶性肿瘤; 合并肝肾等重要器官功能不全; 合并全身性感染等。所有研究对象均签署知情同意书, 本研究经本院伦理委员会审核同意。

1.2 免疫组织化学实验

即用型免疫组织化学 SP 试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司, 严格参照说明书进行操作: 10% 福尔马林固定组织样本, 常规石蜡包埋、切片、脱蜡, 水化; PBS 缓冲液洗涤后, 加入过氧化物阻断剂, 去除内源性过氧化物酶活性; 加入山羊血清, 37℃ 封闭 30min; 加入 FoxO1、MAPLC3、Beclin1 蛋白的一抗工作液 (购自美国 Santa Cruz 公司, 稀释比例 1:100), 4℃ 孵育过夜, PBS 缓冲液洗涤后, 加入生物素化的二抗工作液 (购自北京索莱宝科技有限公司, 稀释比

例 1:100),37℃孵育 60min;DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明,固封。

结果判定:随机选取 3 个高倍视野($\times 400$),每个视野计数 100 个细胞。染色强度计分,0 分:无染色;1 分:淡黄色;2 分:棕黄色;3 分:棕褐色。阳性细胞百分比,0 分:无阳性细胞;1 分:阳性细胞 $\leq 10\%$;2 分:阳性细胞 10%~50%;3 分:阳性细胞 50%~75%;4 分:阳性细胞 $> 75\%$ 。计算染色强度与阳性细胞百分比的乘积, ≤ 3 分为阴性表达, > 3 分为阳性表达。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件,计数资料以例或百分比表示,两组或多组间比较采用卡方(χ^2)检验,等级相关分析采用 Spearman 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FoxO1、MAPLC3、Beclin1 蛋白在不同胃组织中的表达情况

免疫组织化学实验结果显示,FoxO1 蛋白主要定位于细胞核,MAPLC3 蛋白主要定位于细胞质,Beclin1 蛋白主要定位于细胞质。胃癌组织中,FoxO1 蛋白阳性表达率为 31.58%(30/95),低于癌旁组织的 63.27%(31/49),差异有统计学意义($\chi^2=13.293, P < 0.001$);MAPLC3 蛋白阳性表达率为 44.21%(42/95),低于癌旁组织的 93.88%(46/49),差异有统计学意义($\chi^2=33.554, P < 0.001$);Beclin1 蛋白阳性表达率为 40.00%(38/95),低于癌旁组织的 100%(49/49),差异有统计学意义($\chi^2=48.662, P < 0.001$)。见 Figure 1。

2.2 胃癌组织中 FoxO1、MAPLC3、Beclin1 蛋白表达与患者临床病理参数的关系

胃癌组织中,FoxO1 蛋白表达与患者性别、年龄、部位、分化程度均不相关(P 均 > 0.05),而与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有关(P 均 < 0.05);MAPLC3 和 Beclin1 蛋白表达与患者性别、年龄、部位、肿瘤大小、浸润深度均不相关(P 均 > 0.05),而与肿瘤分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期均有关(P 均 < 0.05)。三者共表达阳性率与性别、年龄、部位、分化程度均不相关(P 均 > 0.05),而与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有关(P

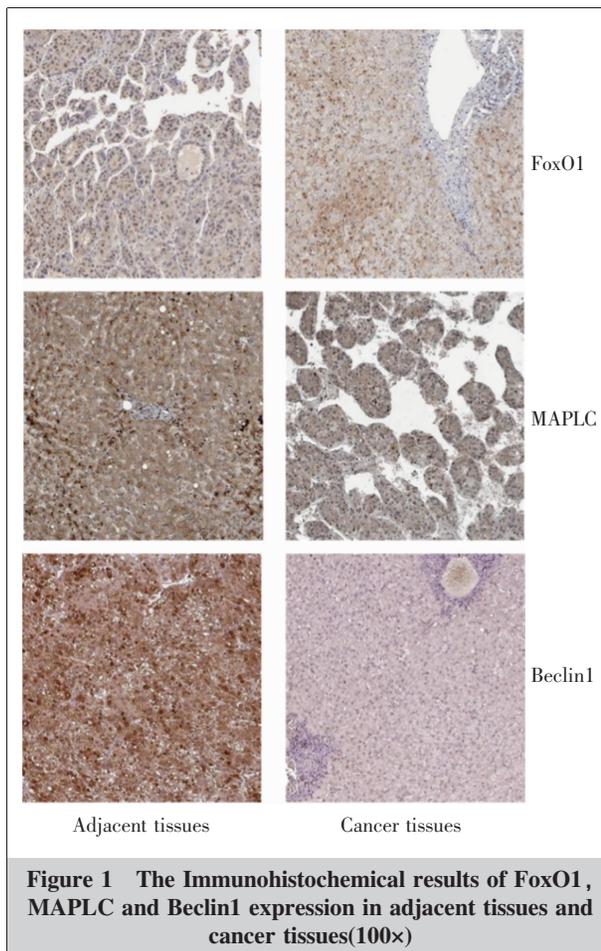


Figure 1 The Immunohistochemical results of FoxO1, MAPLC and Beclin1 expression in adjacent tissues and cancer tissues(100x)

均 < 0.05)。详见 Table 1。

2.3 胃癌组织中 FoxO1、MAPLC3、Beclin1 蛋白表达相关性

Spearman 相关分析结果显示,胃癌组织中 FoxO1 水平与 MAPLC3 水平呈正相关($r=0.345, P=0.017$), FoxO1 水平与 Beclin1 水平呈正相关($r=0.385, P < 0.001$),且 MAPLC3 水平与 Beclin1 水平呈正相关($r=0.604, P < 0.001$)。

3 讨论

自噬是细胞对不良环境的防御机制,是细胞依靠自身溶酶体清除内源性底物的过程,在维持细胞生长分化等基本生命活动中发挥关键作用^[3]。此外,细胞自噬异常与多种疾病发生进展关系紧密,探究自噬水平与疾病进展及预后的关系,对病情评估、预后预测具有重要意义^[7]。

Fox 基因广泛存在于真核生物,其转录产物为

Table 1 The relationship among of FoxO1, MAPLC3 and Beclin1 protein expression and the clinicopathological features in gastric cancer

Clinicopathological features	n	FoxO1			MAPLC3			Beclin1			All		
		Positive (n=30)	Negative (n=65)	χ^2	P	Positive (n=42)	Negative (n=53)	χ^2	P	Positive (n=38)	Other (n=57)	χ^2	P
Gender													
Male	56	18	38	0.020	0.887	25	31	0.010	0.919	25	31	1.225	0.268
Female	39	12	27			17	22			13	26		
Age (years)													
<60	29	10	19	0.163	0.686	14	15	0.280	0.597	12	17	0.033	0.856
≥60	66	20	46			28	38			26	40		
Position													
Antrum	50	11	39	4.886	0.087	19	31	5.646	0.059	18	32	5.207	0.074
Body	26	10	16			10	16			15	11		
Fundus and cardia	19	9	10			13	6			5	14		
Size(cm)													
<5	76	29	47	7.612	0.006	32	44	0.683	0.409	31	45	0.099	0.753
≥5	19	1	18			10	9			7	12		
Differentiation													
High and medium	59	21	38	1.161	0.281	31	28	4.382	0.036	30	29	7.633	0.006
Low	36	9	27			11	25			8	28		
Infiltration depth													
Non-invasive serosa	20	17	3	33.460	<0.001	11	9	1.196	0.274	10	10	1.056	0.304
Invasion of serosa and extraserosa	75	13	62			31	44			28	47		
Lymph node metastasis													
No	22	15	7	17.753	<0.001	15	7	6.670	0.010	19	3	25.643	<0.001
Yes	73	15	58			27	46			19	54		
TNM													
I ~ II	42	21	21	11.823	0.001	28	14	15.392	<0.001	24	18	9.218	0.002
III ~ IV	53	9	44			14	39			14	39		

Fox 蛋白, 其家族所有成员均具有 DNA 结合域, FoxO 亚家族因其参与肿瘤染色体易位, 成为研究最为深入的 Fox 家族成员^[8]。FoxO 同源基因共有 4 个, 即 FoxO1 (又名 FoxO1a)、FoxO3a、FoxO4 和 FoxO6, 定位于不同染色体, 分别具有独特的表达模式, 参与调节细胞凋亡、氧化应激、免疫调节等^[9]。人 FoxO1 基因定位于染色体 13q14.1, 广泛表达于心脏、骨骼肌、胃肠道等组织器官, 其活性在基因水平、翻译后修饰等多种水平上受到调节, 其中 FoxO1 蛋白的磷酸化、乙酰化修饰在其亚细胞定位及功能发挥中起主要作用^[10]。研究发现, FoxO1 可抑制胃癌细胞增殖、侵袭迁移、血管生成, 且与胃癌耐药相关, 是影响胃癌患者预后的因素^[11]。目前的研究多集中在探究 FoxO1 的转录调控作用与胃癌的关系, 仅少数研究 FoxO1 作为细胞自噬调节因子的作用^[12]。研究结果表明, FoxO1 是小鼠胚胎和人肾胚胎细胞中诱导自噬的关键蛋白^[13]; 在肿瘤细胞中, 自噬产生的程序性死亡可遏制细胞生存, FoxO1 可通过活化自噬相关蛋白或干扰自噬调控因子, 激活细胞自噬, 进而发挥抗肿瘤作用^[14]。本研究结果显示, 与癌旁组织相比, FoxO1 蛋白在胃癌组织中表达降低, 提示 FoxO1 低表达与胃癌发生有着

密切关系,此外,免疫组化结果显示,FoxO1 蛋白主要定位于胃癌细胞的细胞核,研究证实 FoxO1 因其亚细胞定位不同,调节自噬的途径亦不相同,细胞核内的 FoxO1 蛋白可通过转录途径诱导基因表达进而发挥调控细胞自噬的功能。

自噬相关基因(ATG)是一类进化保守的基因家族,参与自噬调控。MAPLC3 为 ATG8 基因同源物,定位于前自噬泡和自噬泡表面,可反映自噬体数量,被视为自噬体的特异性标记蛋白;MAPLC3 以 MAPLC3- I 和 MAPLC3- II 两种形式存在,仅 MAPLC3- II 是其活化形式,参与自噬体的形成^[15]。Beclin1 为 ATG6 基因同源物,是维持细胞自噬活性的关键,Beclin1 可激活自噬过程,而 Beclin1 表达缺失可明显增加肺癌、卵巢癌、肝癌的发生率,Beclin1 是潜在的肿瘤抑制基因^[16]。本研究发现,MAPLC3 蛋白、Beclin1 蛋白在胃癌组织中表达下降,以上结果均提示胃癌组织中自噬体减少,细胞自噬水平降低。此外,本研究发现,FoxO1 表达与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有关,而这些临床参数与胃癌增殖、侵袭转移相关,因此推测 FoxO1 低表达的患者胃癌恶性程度较高,预后较差;MAPLC3 和 Beclin1 蛋白与肿瘤分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期均有关,推测 MAPLC3 和 Beclin1 蛋白低表达可能参与胃癌低分化、淋巴结转移,提示胃癌恶性程度较高,因此推测 MAPLC3 和 Beclin1 蛋白低表达同样意味着较差的预后。本研究结果显示三者共表达阳性率与患者性别、年龄、部位、分化程度均不相关,而与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有关,因此三种蛋白共表达阳性明确提示癌症侵袭力高、分化低,因此该类胃腺癌恶性程度最高,推测患者预后最差,需要重点观察,及时调整治疗方案。

Akasaki 等^[17]发现敲除 FoxO1 基因将导致 Beclin1 表达的下降,相反,FoxO 基因的活性复合物能促进 Beclin1 的表达,这可能与 PI3K/Akt 信号通路相关,目前尚少见关于 FoxO1 与 MAPLC3 相关性的研究报告。本研究结果显示,胃癌组织中,FoxO1 与 MAPLC3、FoxO1 与 Beclin1、MAPLC3 与 Beclin1 间水平均呈正相关,提示 FoxO1、MAPLC3、Beclin1 作为自噬相关蛋白,三者之间发挥协同作用,共同诱导胃癌形成,推测 FoxO1 作为转录因子可能通过参与调控 MAPLC3 与 Beclin1 表达,在细胞自噬中发挥调控作用,后续研究将对上述研究假设进行探究。

综上所述,本研究证实胃癌组织中 FoxO1、MAPLC3、Beclin1 蛋白表达均降低,且均与患者较差的临床病理参数有关,FoxO1、MAPLC3、Beclin1 对胃癌患者的诊断和病情进展评估具有一定价值。

参考文献:

- [1] Cabrera-Ortega AA, Feinberg D, Liang Y, et al. The role of forkhead box 1 (FOXO1) in the immune system: dendritic cells, T cells, B cells, and hematopoietic stem cells[J]. Crit Rev Immunol, 2017, 37(1): 1-13.
- [2] Berthelot JM, Stéphane Corvec, Hayem G. SAPHO, autophagy, IL-1, FoxO1, and propionibacterium (cutibacterium) acnes[J]. Joint Bone Spine, 2017, 85(2): 171-176.
- [3] Yu C, Li WB, Liu JB, et al. Autophagy: novel applications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary cancer [J]. Cancer Med, 2017, 7(2): 471-484.
- [4] Zheng S, Han F, Shi Y, et al. Single-prolonged-stress-induced changes in autophagy-related proteins Beclin-1, LC3, and p62 in the medial prefrontal cortex of rats with post-traumatic stress disorder[J]. J Mol Neurosci, 2017, 62(1): 43-54.
- [5] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [6] Pei G, Luo M, Ni X, et al. Autophagy facilitates metadherin-induced chemotherapy resistance through the AMPK/ATG5 pathway in gastric cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(2): 847-859.
- [7] Soria LR, Brunetti-Pierri N. Targeting autophagy for therapy of hyperammonemia[J]. Autophagy, 2018, 14(7): 1273-1275.
- [8] Farhan M, Wang H, Gaur U, et al. FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(7): 815-827.
- [9] Wang Z, Yu T, Huang P. Post-translational modifications of FOXO family proteins (Review)[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(6): 4931-4941.
- [10] Xu M, Chen X, Chen D, et al. FoxO1: a novel insight into its molecular mechanisms in the regulation of skeletal muscle differentiation and fiber type specification [J]. Oncotarget, 2017, 8(6): 10662-10674.
- [11] Choi Y, Park J, Ko YS, et al. FOXO1 reduces tumorsphere formation capacity and has crosstalk with LGR5 signaling in gastric cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(3): 1349-1355.
- [12] Hong-Brown LQ, Brown CR, Navaratnarajah M, et al. FoxO1-AMPK-ULK1 regulates ethanol-induced autophagy in muscle by enhanced ATG14 association with the BECN1-PIK3C3 complex[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2017, 41(5): 895-910.
- [13] Zhou J, Liao W, Yang J, et al. FOXO3 induces FOXO1-dependent autophagy by activating the AKT1 signaling pathway[J]. Autophagy, 2012, 8(12): 1712-1723.
- [14] Li J, Chen T, Xiao M, et al. Mouse Sirt3 promotes autophagy in AngII-induced myocardial hypertrophy through the deacetylation of FoxO1 [J]. Oncotarget, 2016, 7(52): 86648-86659.
- [15] Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions [J]. FASEB J, 2016, 30(12): 3961-3978.
- [16] Ranaghan MJ, Durney MA, Mesleh MF, et al. The autophagy-related beclin-1 protein requires the Coiled-Coil and BARA domains to form a homodimer with submicromolar affinity[J]. Biochemistry, 2017, 56(51): 6639-6651.
- [17] Akasaki Y, Alvarez-Garcia O, Saito M, et al. FoxO transcription factors support oxidative stress resistance in human chondrocytes [J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(12): 3349-3358.