

- ease[J]. *Nephron Clin Pract*, 2014, 127(1/2/3/4): 139-143.
- [9] Rong ZH, Liang SC, Lu JQ, et al. Effect of intermittent fasting on physiology and gut Microbiota in presenium rats[J]. *J South Med Univ*, 2016, 37(4): 423-430.
- [10] 熊青, 杨学军, 任汐, 等. 肠道菌群特征与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(33): 4658-4660.
- [11] 马苏娴, 张锐锐, 王苏, 等. 2 型糖尿病患者肠道菌群变化及意义[J]. *山东医药*, 2017, 57(16): 20-23.
- [12] Steen O, Goldenberg RM. The role of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in the management of type 2 diabetes[J]. *Can J Diabetes*, 2017, 41(5): 517-523.
- [13] Dominguez Rieg JA, Chirasani VR, Koepsell H, et al. Regulation of intestinal SGLT1 by catestatin in hyperleptinemic type 2 diabetic mice[J]. *Lab Invest*, 2016, 96(1): 98-111.
- [14] de Matos MA, Duarte TC, Ottone Vde O, et al. The effect of insulin resistance and exercise on the percentage of CD16(+) monocyte subset in obese individuals[J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(4): 209-216.
- [15] Singhal A, Agrawal A, Ling J. Regulation of insulin resistance and type II diabetes by hepatitis C virus infection: A driver function of circulating miRNAs [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(4): 2071-2085.
- [16] 李琳琳, 杨浩, 王焯. 肠道菌群代谢产物短链脂肪酸与 2 型糖尿病的关系[J]. *新疆医科大学学报*, 2017, 40(12): 1517-1521.
- [17] 赵涛, 乐静, 李传静, 等. 二甲双胍对 2 型糖尿病胰岛素抵抗患者糖脂代谢及脂肪因子的影响[J]. *安徽医药*, 2016, 20(7): 1382-1385.
- [18] 巩静, 陈广, 王定坤, 等. 从脾胃论治糖尿病与肠道菌群的关系[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(4): 484-487.

收稿日期: 2019-03-30 编辑: 王国品

· 临床研究 ·

自噬相关蛋白 p62、Beclin1 在宫颈癌组织中的表达及意义

周冠琼¹, 戴红艳¹, 王昊珏¹, 文洽先², 张振勇²

1. 无锡市锡山人民医院妇产科, 江苏 无锡 214100; 2. 无锡市第三人民医院肿瘤科, 江苏 无锡 214000

摘要: **目的** 探究自噬相关蛋白 p62、Beclin1 在宫颈癌组织中的表达, 并分析其意义。**方法** 选取 2016 年 1 月到 2018 年 12 月诊治的 120 例宫颈癌患者手术切除宫颈癌组织为研究对象, 另外选取 50 例未癌变子宫肌瘤患者手术切除的宫颈组织和 50 例手术切除获取的宫颈上皮内瘤变组织(CIN III)作为对照组, 分别检测其 p62、Beclin1 表达情况, 并分析其相关性。**结果** p62 主要在宫颈鳞状细胞癌和 CIN III 组织细胞核中表达, 染色呈黄褐色; Beclin1 主要在正常宫颈上皮和 CIN III 组织细胞的细胞质和膜中表达, 染色呈黄棕色。p62 在子宫颈鳞状细胞癌中阳性表达明显高于正常宫颈上皮和 CIN III 组织($P < 0.017$), Beclin1 与之相反, 其宫颈癌阳性表达明显低于正常宫颈上皮和 CIN III 组织($P < 0.017$); 有淋巴结转移患者 p62 在细胞质表达高于无淋巴结转移患者($P < 0.05$), p62 在胞核、Beclin1 在胞膜和 Beclin1 在胞质表达均与患者其他临床特征无关($P > 0.05$)。**结论** 自噬相关蛋白 p62、Beclin1 表达与宫颈癌发生和进展相关, 并且 p62 表达与宫颈癌预后相关, 二者表达或可用于评估癌症的发生与发展。

关键词: 自噬相关蛋白; p62; Beclin1; 宫颈癌; 蛋白表达

中图分类号: R 737.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2019)12-1685-04

Expression of autophagy-related proteins p62 and Beclin1 in cervical cancer tissues and their significance

ZHOU Guan-qiong*, DAI Hong-yan, WANG Hao-jue, WEN Qia-xian, ZHANG Zhen-yong

*Department of Obstetrics and Gynecology, Xishan People's Hospital, Wuxi, Jiangsu 214100, China

Corresponding author: WEN Qia-xian, E-mail: ayrikk@126.com

Abstract: Objective To explore the expression of autophagy-related proteins p62 and Beclin1 in cervical cancer tissues and their significance. **Methods** From January 2016 to December 2018, 120 cases of cervical cancer tissues, 50 cases of

cervical tissues of non-cancerous uterine myoma and 50 cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN III) tissues obtained by surgical resection were selected as the study objects. The expression levels of p62 and Beclin1 in three kinds of tissues were detected, respectively, and the correlation was analyzed between them. **Results** p62 was mainly expressed in the cell nucleus of cervical squamous carcinoma cells and CIN III tissues with yellowish-brown staining. Beclin 1 was mainly expressed in the cytoplasm and the membrane of normal cervical epithelium and CIN III cells with yellowish-brown staining. The positive expression of p62 in cervical squamous carcinoma cells was significantly higher than that in normal cervical epithelium and CIN III tissues ($P < 0.017$), while the positive expression of Beclin 1 was significantly lower than that in normal cervical epithelium and CIN III tissues ($P < 0.017$), respectively. The expression of p62 in patients with lymph node metastasis was higher than that in patients without lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expressions of p62 and Beclin 1 were not related to other clinical features of patients ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression levels of autophagy-related proteins p62 and Beclin1 are associated with the occurrence and progression of cervical cancer, and p62 expression is associated with the prognosis of cervical cancer. Both p62 and Beclin1 may be used to evaluate the occurrence and development of cancer.

Key words: Autophagy-related protein; p62; Beclin1; Cervical cancer; Protein expression

Fund program: Scientific and Technological Achievements and Appropriate Technology Promotion Project of Wuxi Health and Family Planning Commission (T201746)

宫颈癌超过 90% 为人乳头状瘤病毒(HPV)感染所致^[1-2]。大多数 HPV 感染后被免疫系统清除从而不会引起症状并自发消退,但 HPV 持续感染则可能导致疣或癌前病变^[2-3]。若发展为宫颈癌,便会危及患者生命。现阶段通过宫颈筛查然后进行活组织检查,并结合医学成像判断癌症是否扩散,此步骤较为繁复,若能够寻找到特异性较高并敏感的指标则能简化诊断^[4-6]。本研究拟从自噬相关蛋白 p62、Beclin1 入手,观察其在宫颈癌组织中的表达情况,并分析其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月到 2018 年 12 月诊治的 120 例宫颈癌患者,全部归为观察组,手术时获得宫颈癌组织,迅速置于液氮中保藏,用于后续实验。纳入标准:确诊为宫颈癌^[6],无其他恶性肿瘤,同意参与研究并签署知情同意书。排除标准:曾化疗的患者,患免疫系统疾病,患糖尿病和/或高血压。另外选取同时间段进行手术切除获得的 50 例良性(未发生癌变)子宫肌瘤患者的宫颈组织和 50 例手术时切除的宫颈上皮内瘤变组织(CIN III)作为对照组。观察组年龄 29 ~ 63 (45.62 ± 10.77) 岁;癌症临床 I 期 74 例,II 期 46 例;肿瘤直径 ≤ 4 cm 70 例, > 4 cm 者 50 例。

1.2 观测指标

1.2.1 实验器材和试剂 Anti-Beclin1 兔抗人单克隆抗体(ab51031, abcam, 英国), Anti-p62 鼠抗人单克隆抗体(ab56416, abcam, 英国), 免疫组化试剂盒(SP0011 或 SP0021, Solarbio), DAB 显色剂(DA1010,

Solarbio), 石蜡切片机(RM2016, Lieca, 德国), 其他实验试剂均购于阿拉丁公司。

1.2.2 实验方法 免疫组化: 首先将组织置于多聚甲醛(4%)中固定 4 h, 后放入包埋盒进行脱水, 用石蜡包裹组织后切片。将石蜡切片置于 68 °C 下烤片 20 min 后, 室温下使用二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水, 随后使用 3% 双氧水孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶, 孵育完成后 PBS 冲洗 5 min, 重复 3 次。将按上述操作处理好的切片置于柠檬酸缓冲液(pH 6.0, 0.01 M)中煮沸 15 min, 室温冷却后使用 PBS 冲洗 3 次。吸干水分, 依次加入封闭液和一抗孵育, 其中一抗需低温(4 °C)过夜。次日依次滴加二抗和 SP 溶液(streptavidin-peroxidase), 室温孵育后使用 DAB 染色, 使用苏木素复染, 清洗完全后脱水待测^[7-8]。

结果评估: 采用双盲法, 于高倍镜下进行阳性细胞数计数并评分, 每 100 个细胞中无细胞或极个别呈阳性计 0, 阳性细胞 < 1/3 计 1, 阳性细胞 ≥ 1/3 计 2; 染色强度评分为, 阳性细胞未染色计 0, 染为浅黄色计 1, 为黄棕色计 2, 为深褐色计 3; 将两评估结果相乘, 乘积 ≥ 2 为阳性, 其余则为阴性^[9]。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 24.0 软件进行数据处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验比较; 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 使用 $R \times C$ 表 χ^2 检验及其分割法; 使用 Pearson 分析相关性。检验水准取 $\alpha = 0.05$, 采用 $R \times C$ 表 χ^2 检验分割法时, 校正为 $\alpha = 0.017$ 。

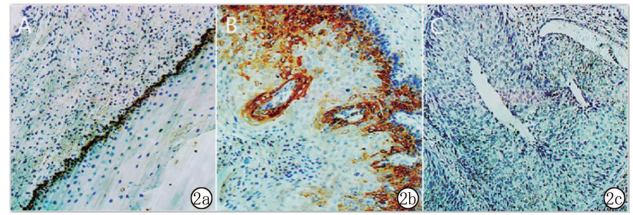
2 结果

2.1 p62 和 Beclin1 在三组组织中表达情况 p62 主要在宫颈鳞状细胞癌和 CIN III 组织细胞核中表达, 染

色呈黄褐色; Beclin1 主要在正常子宫颈上皮和 CIN III 组织细胞的细胞质和细胞膜中表达, 染色呈黄棕色。p62 在子宫颈鳞状细胞癌中阳性表达明显高于正常子宫颈上皮和 CIN III 组织 ($P < 0.017$), Beclin1 与之相反, 其宫颈癌阳性表达明显低于正常子宫颈上皮和 CIN III 组织 ($P < 0.017$)。见图 1、图 2、表 1。

2.2 p62 与 Beclin1 表达与临床特征的关系 有淋巴结转移患者 p62 在胞质表达高于无淋巴结转移患者 ($P < 0.05$), p62 在胞核、Beclin1 在胞膜和 Beclin1

在胞质表达均与患者其他临床特征无关 ($P > 0.05$)。见表 2。



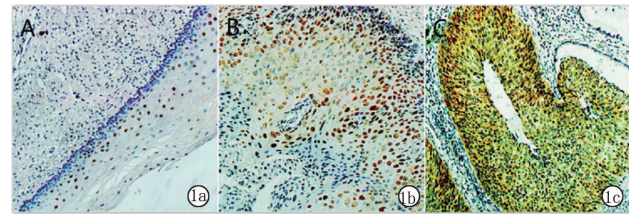
注: 2a: 正常子宫颈上皮; 2b: CIN III 组织; 2c: 子宫颈鳞状细胞癌。

图 2 Beclin1 在三组组织中表达情况

表 1 p62 和 Beclin1 在三组组织中表达情况 例 (%)

组别	例数	p62		Beclin1	
		+	-	+	-
正常子宫颈上皮	50	18(36.0)	32(64.0)	41(82.0)	9(18.0)
CIN III 组织	50	20(40.0)	3(6.0)	38(76.0)	12(24.0)
子宫颈鳞状细胞癌	120	82(68.3) ^{ab}	38(31.7) ^{ab}	27(22.5) ^{ab}	93(77.5) ^{ab}

注: 与正常子宫颈组相比, ^a $P < 0.017$; 与 CIN III 组相比, ^b $P < 0.017$ 。



注: 1a: 正常子宫颈上皮; 1b: CIN III 组织; 1c: 子宫颈鳞状细胞癌。

图 1 p62 在三组组织中表达情况

表 2 p62 与 Beclin1 表达与宫颈鳞状细胞癌临床特征的关系 (例, $n = 120$)

临床特征	例数	p62(核)		χ^2/P 值	p62(质)		χ^2/P 值	Beclin1(膜)		χ^2/P 值	Beclin1(质)		χ^2/P 值	
		+	-		+	-		+	-		+	-		
年龄(岁)	>45	50	34	16	0.004/	38	12	2.328/	10	40	0.307/	0	50	- / >0.05
	≤ 45	70	48	22	>0.05	44	26	>0.05	17	53	>0.05	3	67	- / >0.05
临床分期	I	74	50	24	0.052/	49	25	0.400/	18	56	0.368/	3	71	- / >0.05
	II	46	32	14	>0.05	33	13	>0.05	9	37	>0.05	0	46	- / >0.05
淋巴结转移	有	49	33	16	0.037/	42	7	15.561/	12	37	0.188/	0	49	- / >0.05
	无	71	49	22	>0.05	40	31	<0.05	15	56	>0.05	3	68	- / >0.05
肿瘤直径(cm)	>4	40	23	17	3.254/	30	10	1.232/	8	32	0.215/	1	39	- / >0.05
	≤ 4	80	59	21	>0.05	52	28	>0.05	19	61	>0.05	2	68	- / >0.05
组织分化	高分化	21	13	8		16	5		8	13		0	21	
	中分化	67	49	18	1.618/	43	24	1.319/	13	54	3.556/	3	64	- / >0.0
	低分化	32	20	12	>0.05	23	9	>0.05	6	26	>0.05	0	32	

3 讨论

自噬允许细胞组分有序降解和再循环, 主要分为巨自噬、微自噬和分子介导自噬^[10-11]。其中分子介导自噬(CMA)是一个复杂的过程, 涉及 hsc70 复合物的识别, 因此蛋白必须含有 hsc70 复合物识别位点, 形成 CMA-底物/伴侣复合物, 然后这种复合物转移至溶酶体膜结合蛋白, 该蛋白识别复合物并与其结合, 使其进入细胞^[12-13]。这一过程中, 雷帕霉素靶蛋白(mTORC1)激活后, 磷酸化自噬相关蛋白, 阻止其进入 ULK1 激酶复合物, 以抑制自噬; 另外, mTORC1 抑制自噬同时刺激蛋白质合成和细胞生长的能力可导致受损蛋白质和细胞器的累积, 从而导致细胞水平的损伤^[14]。自噬一方面可增强细胞活性, 以抵抗氧化代谢压力; 另一方面, 自噬能够帮助功能缺陷细胞增强生存能力, 以此便利于肿瘤细胞存活。

研究表明, 敲除 Beclin1 基因后, 细胞呈现出细胞器和蛋白质异常; p62 蛋白失活后自噬会发生功能障

碍, 导致细胞器和细胞代谢异常, 从而增加机体炎症继而引发肿瘤^[15-16]。本研究观测 p62 和 Beclin1 表达情况发现, p62 主要表达于子宫颈鳞状细胞癌和 CIN III 组织细胞核中, 且其在子宫颈鳞状细胞癌中表达量明显更高; Beclin1 主要表达于正常子宫颈上皮和 CIN III 组织细胞的细胞质和细胞膜中。p62 合成可溶胞质前体, 然后进行修饰, 与核膜结合的蛋白复合; 同时 p62 还能与和转运因子(NTF2)相互作用, 参与细胞核和细胞质间蛋白运输; 因此 p62 主要在细胞核中表达^[17]。而 Beclin1 由 BECN1 基因编码, 则主要定位与细胞器和细胞核膜上, 本观察结果与其一致^[18]。有报道显示, 当细胞自噬时, p62 与自噬体内膜上 LC3 II 结合被溶酶体降解; 而 Beclin1 可在肿瘤细胞株中表达, 且癌组织中 Beclin1 表达量明显低于正常组织, 本研究结果与其一致^[19-21]。笔者推测, Beclin1 可能通过与激酶组成复合物以调控自噬小体活性, 从而影响自噬; 而自噬活性降低使得细胞内环境失衡, 从而利于肿瘤细胞生长。

另外,分析 p62 与 Beclin1 表达与临床特征的相关性发现,有淋巴结转移患者 p62 在细胞质的表达高于无淋巴结转移患者。有研究表明,淋巴结是否转移是宫颈癌患者预后重要因素之一,因此可得知,p62 高表达与宫颈癌患者预后密切相关。另有报道显示,抑制自噬活性可增强抗癌药物治疗效果,因而后期可通过诱导 p62 表达增加自噬活性,从而增加癌细胞对药物和物理治疗的敏感性,以达到改善患者预后的目的。

结合 p62 定位信息,大量 p62 定位于癌组织细胞质中可能是因为 p62 在其中发生了由核向质的表达转移。因此笔者推测,这一转移过程可能与癌组织的发生和发展相关。这一转移过程并未在本研究中被观察到,需要下一步实验证明。其次,核质转移这一定向运动的分子机制也尚未明晰,也需要进一步验证和讨论。

综上所述,自噬相关蛋白 p62、Beclin1 表达与宫颈癌发生和进展相关,并且 p62 表达与宫颈癌预后相关,二者表达可用于评估癌症的发生与发展。

参考文献

[1] Small W Jr, Bacon MA, Bajaj A, et al. Cervical cancer: a global health crisis[J]. *Cancer*,2017,123(13):2404-2412.

[2] Chetty R. 70 years of the JCP-highly cited papers: the causal relation between human papillomavirus and cervical cancer [J]. *J Clin Pathol*,2017,70(12):997.

[3] Stevanović S, Draper LM, Langan MM, et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells[J]. *J Clin Oncol*,2015,33(14):1543-1550.

[4] 张洁,张亚利,林瑞贞,等. 多 b 值 DWI 在宫颈癌及 CIN III 诊断中的应用[J]. *实用放射学杂志*,2017,33(5):715-719.

[5] Lim AW, Landy R, Castanon A, et al. Cytology in the diagnosis of cervical cancer in symptomatic young women: a retrospective review [J]. *Br J Gen Pract*,2016,66(653):e871-e879.

[6] 陶霞,温宏武,李雪迎,等. 宫颈癌住院患者 10 年临床特点变化及筛查作用探讨[J]. *实用妇产科杂志*,2016,32(2):106-109.

[7] Zhang L, Yang J, Tian YM, et al. Beneficial effects of hypoxic preconditioning on human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. *Chin J Physiol*,2015,58(5):343-353.

[8] Kerkar SP, Wang ZF, Lasota J, et al. MAGE-A is more highly expressed than NY-ESO-1 in a systematic immunohistochemical analysis of 3668 cases[J]. *J Immunother*,2016,39(4):181-187.

[9] 张凯彬,石晶,李杨,等. 大鼠软骨非全层损伤模型的建立及活化细胞与整合素 $\beta 1$ 表达关系的研究[J]. *中国修复重建外科杂志*,2016,30(4):432-439.

[10] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*,2008,132(1):27-42.

[11] Ho TT, Warr MR, Adelman ER, et al. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells[J]. *Nature*,2017,543(7644):205-210.

[12] Catarino S, Pereira P, Girão H. Molecular control of chaperone-mediated autophagy[J]. *Essays Biochem*,2017,61(6):663-674.

[13] Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2018,19(6):365-381.

[14] Thielpold AL, Lorenz NI, Foltyn M, et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 activation sensitizes human glioma cells to hypoxia-induced cell death[J]. *Brain*,2017,140(10):2623-2638.

[15] Chen QH, Yu SL, Zhang K, et al. Exogenous H2S inhibits autophagy in unilateral ureteral obstruction mouse renal tubule cells by regulating the ROS-AMPK signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*,2018,49(6):2200-2213.

[16] Liu HY, Dai CQ, Fan YL, et al. From autophagy to mitophagy: the roles of P62 in neurodegenerative diseases[J]. *J Bioenerg Biomembr*,2017,49(5):413-422.

[17] Lappas M. The adaptor protein p62 mediates nuclear factor κB activation in response to inflammation and facilitates the formation of prolabor mediators in human myometrium[J]. *Reprod Sci*,2017,24(5):762-772.

[18] Ames K, Da Cunha DS, Gonzalez B, et al. A non-cell-autonomous role of BEC-1/BECN1/Beclin1 in coordinating cell-cycle progression and stem cell proliferation during germline development[J]. *Curr Biol*,2017,27(6):905-913.

[19] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. *Autophagy*,2012,8(4):445-544.

[20] Zhang XM, Li HJ, Wang D, et al. Expressions and clinical significance of autophagy-related genes ATG2B, ATG4D, ATG9B in breast carcinoma[J]. *J Sichuan Univ Med Sci Ed*,2016,47(2):184-188.

[21] Zhu BS, Zhao K, Jia X, et al. Effects of damage-regulated autophagy regulator gene on the SGC7901 human gastric cancer cell line[J]. *Oncol Lett*,2014,8(2):657-662.

收稿日期:2019-04-13 编辑:王国品