

自噬标志物 LC3B 表达水平的改变与星形细胞瘤手术患者预后的相关性研究

王航 宋歌 刘永建 谢万福

【摘要】 目的 评估两种自噬标志物 LC3B 和 Beclin-1 的蛋白表达水平与星形细胞瘤患者的临床参数之间的关系。**方法** 回顾性收集 2009 年 12 月 - 2012 年 12 月星形细胞瘤患者的 106 个薄切片,通过切片染色分析 LC3B 和 Beclin-1 与患者生存时间的关系。**结果** 发现 LC3B 与蛋白质表达水平与抗辐射或化学疗法显著相关($P = 0.02$);高强度的 LC3B 染色预示着不良的预后($P = 0.03$);Beclin-1 蛋白表达水平与患者的总体生存率不相关;CD133 和 LC3B 高表达的患者的总生存期为 38 个月,CD133 和 LC3B 两者均为弱表达的患者的总生存期为 50 个月,CD133 和 LC3B 高表达的患者的生存时间明显短于 CD133 和 LC3B 低表达者($P = 0.049$)。**结论** 星形细胞瘤癌症干细胞样细胞和增强的自噬可引起对放射疗法/化学疗法的抗性,并且针对星形细胞瘤中的癌症干细胞样细胞可提供可行的治疗方法。

【关键词】 星形细胞瘤 自噬 LC3B Beclin-1

【中图分类号】 R739.41 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2018)05-0572-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2018.05.019

The association between altered expression level of the autophagy marker LC3B and poor prognosis in astrocytoma Wang Hang, Song Ge, Liu Yongjian, et al. Department of Neurosurgery, Hanzhoung People's Hospital, Hanzhoung Shanxi 723000

【Abstract】 Objective To evaluate the relationship between the expression levels of two autophagy markers LC3B, Beclin-1 and the clinical parameters of astrocytoma patients. **Methods** A total of 106 thin sections from patients with astrocytoma from December 2009 to December 2012 were retrospectively collected. The relationship between LC3B and Beclin-1 expression levels and patient's survival time was analyzed by section staining. **Results** LC3B expression level was found to be correlated significantly with protein expression level and anti-radiation or chemotherapy ($P = 0.02$). High-intensity LC3B staining predicted a poor prognosis ($P = 0.03$). Beclin-1 protein expression level was not associated with overall patient survival. Overall survival was 38 months for CD133 and LC3B-overexpressing patients, 50 months for patients with both CD133 and LC3B being poorly expressed, and significantly longer for CD133 and LC3B-overexpressing patients than that for CD133 And LC3B low expression levels ($P = 0.049$). **Conclusion** Astrocytoma cancer stem cell-like cells and enhanced autophagy could cause resistance to radiotherapy / chemotherapy and provide viable therapies for cancer stem cell-like cells in astrocytoma.

【Key words】 Astrocytoma Autophagy LC3B Beclin-1

星形细胞瘤是人类最常见的脑肿瘤。世界卫生组织(WHO)^[1]根据肿瘤的程度将星形细胞瘤分为4级,其中Ⅲ级和Ⅳ级肿瘤是高度恶性的,分别以间变性星形细胞瘤和多形性胶质母细胞瘤(GBM)为例,它是人类最常见和最恶性的原发性脑肿瘤。为了早预防早治疗,进行了大量与星形细胞瘤的严重

程度相关的生物标志物如环氧合酶-2^[2],胰岛素样生长因子结合蛋白^[3]、肌醇^[4]的表达水平影响星形细胞瘤进展的研究。然而相关的机制研究较少。

癌症干细胞(cancer stem cell, CSC)是指具有干细胞特征的癌细胞,能够自我更新,并且产生异质性的肿瘤^[5]。胶质母细胞瘤中 CSC 细胞的放射性抗性和化疗耐药性已被确定^[6-7],这是患者临床疗效差的一个原因。CSCs 对抗化疗可能是因为 CD133⁺ 细胞下调自噬相关蛋白^[8]。

自噬构成了分解代谢机制,通过溶酶体降解不

必要或功能失调的细胞组分^[9]。最近的研究表明,自噬不仅在调控癌症发展中发挥重要作用,而且在癌细胞对抗癌治疗的反应方面也可能发挥作用^[10-11]。随后的研究还鉴定了微管相关蛋白 1 轻链 3(Microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)^[12-13] 和 Beclin-1^[14-15] 作为自噬的基本标记。其中 LC3B 是化疗后晚期乳腺癌的预后指标^[16]。

本研究评估星形细胞瘤患者中 LC3B 和 Beclin-1 的蛋白表达水平。同时,由于癌样干细胞已被发现是新型抗癌疗法的有吸引力的靶标^[17-18],本研究也分析了 CD133 在星形细胞瘤患者中的表达水平。

1 对象与方法

1.1 研究对象

根据手术记录、医疗记录、病理报告和 MRI 图像,回顾性收集本院神经外科于 2009 年 12 月 - 2012 年 12 月诊断的星形细胞瘤患者的 218 张薄切片。排除了免疫组织化学染色较差的样本、病例记录不完整或没有随访资料的患者。最后本研究共选取 106 个样本进行研究。本研究经本院评估委员会批准。

1.2 免疫组织化学染色

为了检索免疫组织化学染色的抗原,福尔马林固定,石蜡包埋的组织块的 3 μm 切片脱石蜡,再水合,并在 121 ℃ 的温度下在 pH9.0 的目标回收溶液(Dako,Glostrup,丹麦)中高压灭菌 10 min;通过在室温下在 3%过氧化氢中孵育 5 min 来阻断切片中的内源性过氧化物酶;然后将切片在 Tris 缓冲液(Dako,K9001)中洗涤并与 1:200 稀释的兔多克隆抗人 CD133(Biorbyt,orb18124,UK),Beclin-1(abcam,ab16998,USA)和 LC3B (SANTACRUZE,sc-16755,欧洲)抗体在室温下 1 h;用 Tris-缓冲溶液洗涤后将切片与缀合有辣根过氧化物酶的第二抗体在室温下孵育 30 min;随后将载玻片在 3,3-二氨基联苯胺中孵育 5 min,然后将梅耶苏木精复染 60 s,并用 Entellan(产品编号 HX247305,Merck)固定;在双盲的情况下评估免疫组织化学染色的切片;Beclin-1 和 LC3B 的染色评分如下:阴性:0 分(没有或 <10%的肿瘤阳性细胞);弱阳性:1 分(肿瘤阳性细胞 10%~30%);阳性:2 分(30%~70%的肿瘤阳性细胞);强阳性:3 分(70%~100%)。CD133 染色评分为阴性:0 分(如果 65%的细胞被抗体染色);弱阳性:1 分(5%~20%,包括 20%的染色细胞);阳性:2 分(20%~50%,包括 50%的染色细胞);强阳性:3

分(>50%的染色细胞)^[19]。对于统计分析,0 分和 1 分定义为低表达组,2 分和 3 分定义为高表达组^[20]。同时从病例中获取患者的年龄、性别、肿瘤分级、接受放疗或化疗的基本资料。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 (SPSS,Chicago,IL,USA);采用卡方检验分析 Beclin-1 和 LC3B 蛋白表达水平与临床资料的关系;采用 Kaplan-Meier 法进行 log-rank 检验分析生存率。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LC3B 和 Beclin-1 蛋白表达水平与临床参数的关系

图 1 和图 2 分别显示了 Beclin-1 和 LC3B 的表达水平强弱,即低、中、高强度的免疫化学染色。星形细胞瘤患者的年龄、性别、肿瘤分级以及化疗耐受性均未与 Beclin-1 蛋白表达水平有关系(表 1)。LC3B 蛋白表达水平与辐射或化疗有关系($P=0.02$)。没有其他临床参数与 LC3B 蛋白表达水平有关系(表 1)。Beclin-1 蛋白表达水平与患者其他的临床参数无明显关系,同时与患者辐射、化疗也无明显关系(表 1)。

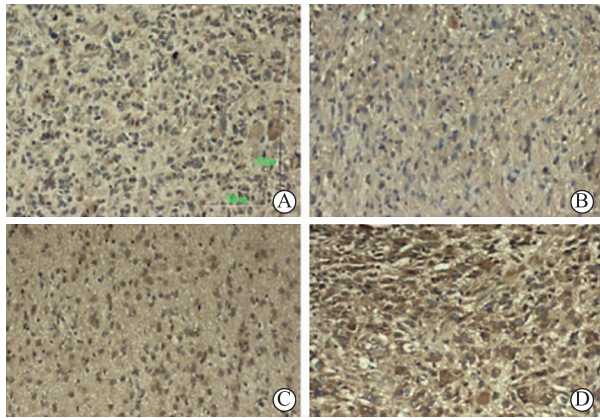


图 1 星形细胞瘤切片中 Beclin-1 蛋白表达水平的代表性免疫组织化学染色 A 为 0 分,极低强度组;B 为得分 1,低强度组;C 为得分 2,中强度组;D 为 3 分,高强度组 (×100 倍)

2.2 LC3B 和 Beclin-1 蛋白表达水平与生存率的关系

Beclin-1 蛋白表达水平与患者的总体生存率不相关(图 3)。相反,LC3B 的免疫化学染色的高强度预测不良预后(图 4)。同样,LC3B 蛋白表达阴性或

弱阳性表现出与高 LC3B 水平相似的生存曲线。LC3B 表达的低水平和中等水平的生存率要比 LC3B 表达的高水平的生存率高(图 4)。

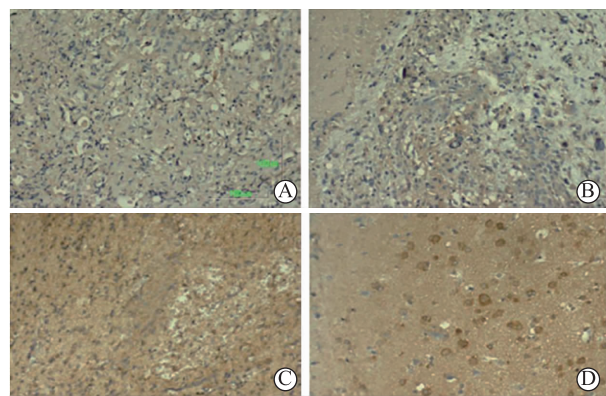


图 2 星形细胞瘤切片中 LC3B 蛋白表达水平的代表性免疫组织化学染色 A 为 0 分,极低强度组;B 为得分 1,低强度组;C 为得分 2,中强度组;D 为 3 分,高强度组(×100 倍)

临床参数	LC3B					Beclin-1				
	0	1	2	3	P	0	1	2	3	P
年龄(例)					0.312					0.244
>65 岁	16	19	14	15		9	17	18	20	
≤65 岁	12	12	17	1		7	12	13	10	
性别(例)					0.221					0.453
男	15	17	18	6		4	14	19	19	
女	13	14	13	10		12	15	12	11	
肿瘤分级(例)					0.563					0.312
I 级	2	5	3	0		0	2	4	4	
II 级	4	8	2	2		1	4	5	6	
III 级	5	4	6	2		4	5	4	4	
IV 级	17	14	20	12		11	18	18	16	
放疗/化疗(例)					0.021					0.071
是	8	10	24	15		8	18	19	21	
否	20	21	7	1		8	11	12	9	

注:LC3B 为微管相关蛋白 1 轻链 3B 型

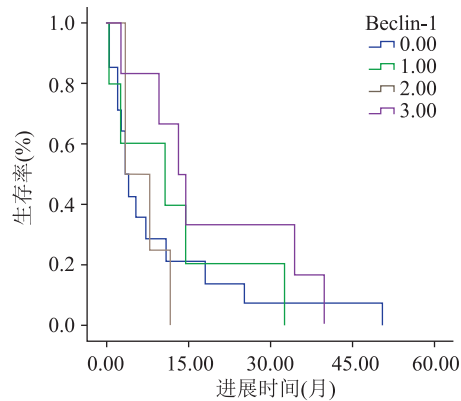


图 3 使用 Kaplan-Meier 方法和 log-rank 检验评估 Beclin-1 蛋白表达水平与星形细胞瘤患者总生存率的关系($P>0.05$)

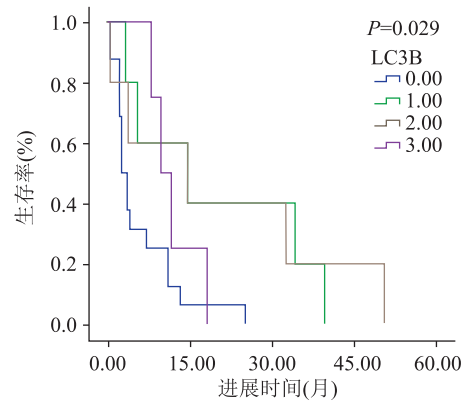


图 4 使用 Kaplan-Meier 方法和 log-rank 检验评估 LC3B 蛋白表达水平与星形细胞瘤患者总生存率的关系 高强度的 LC3B 免疫组织化学染色预测不良预后;LC3B 蛋白表达阴性也存在相似的生存曲线

2.3 CD133 和 LC3B 表达水平在星形细胞瘤中的预后价值

图 5 显示了具有弱、低、中、高强度的 CD133 的代表性免疫化学染色切片。CD133 和 LC3B 高表达的患者的总生存期为 38 个月,而 CD133 和 LC3B 两者均为弱表达的患者的总生存期为 170 个月(图 6)。CD133 和 LC3B 的高水平表达是星形细胞瘤预后不良的指标($P<0.05$)。

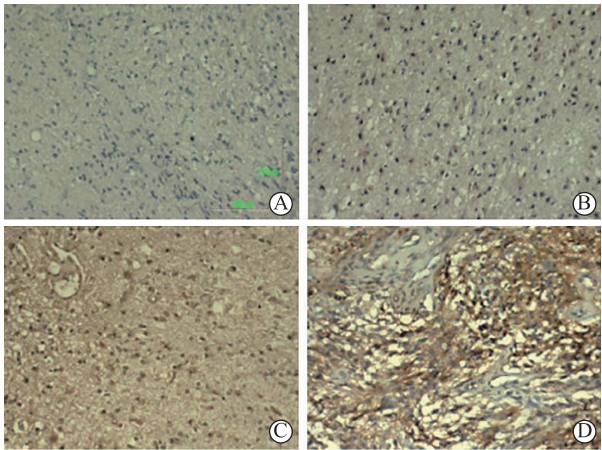


图 5 在星形细胞瘤切片中代表性的免疫组织化学染色 CD133(癌症干细胞样细胞标记物) A 为 0 分,极低强度组;B 为得分 1,低强度组;C 为得分 2,中强度组;D 为 3 分,高强度组(×100 倍)

3 讨论

IV 级星形细胞瘤是最常见的一类恶性原发性脑肿瘤,也是最具侵袭性的癌症之一。先前的研究表明,癌症干细胞样细胞对放疗或化疗耐药^[6],并且这

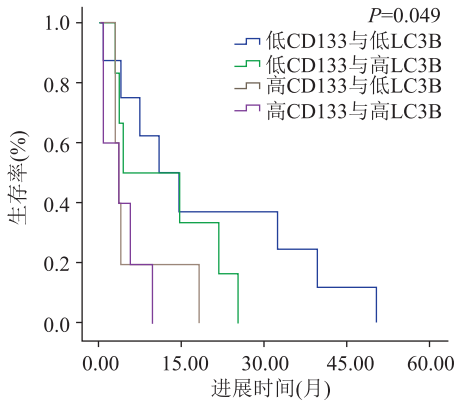


图6 使用Kaplan-Meier方法和log-rank检验评估CD133和LC3B蛋白表达水平的组合与星形细胞瘤患者的生存率的关系。CD133和LC3B高表达患者的平均总生存期为38个月,CD133和LC3B两者均为弱表达的患者平均总生存期为50个月。

些细胞的富集是预后不良的指征^[21-23]。由于LC3B蛋白的表达水平与放疗和化疗的耐药性相关(表1),本研究评估了CD133与LC3B在总体生存中的表达。诊断后的中位生存期通常只有14个月^[24]。GBM管理的标准治疗包括手术切除、局灶放疗、以及替莫唑胺等烷化剂治疗^[25]。然而这些治疗方法并不能有效地提高GBM患者的存活率。因此,目前研究主要集中在探究预测患者预后的通路和分子标记方面上。

本研究发现自噬标志物LC3B的表达水平增高与星形细胞瘤患者的放疗/化疗有关,并且影响患者的生存率。此外,增加LC3B的表达以及增强的CD133水平也与不良预后显著相关。有研究报道,自噬抑制剂可使肝癌干细胞(LCSCs)、乳腺癌细胞对肿瘤微环境更敏感,并可用于改善抗癌治疗^[24]。同样,雷帕霉素在神经胶质瘤起始细胞中诱导自噬也增加了对辐射的敏感性^[26]。

自噬构成了基本的分解代谢机制,其涉及通过溶酶体降解不必要或功能失调的细胞组分^[9]。自噬是一把双刃剑,一方面自噬可以上调自噬水平导致耐药性的癌细胞的凋亡;另一方面恶性肿瘤细胞的转移和扩散也离不开自噬的作用,肿瘤细胞在抵抗化疗药物杀伤过程中自噬也起到重要保护作用。通过激活自噬,选择性识别和清除未折叠蛋白质和受损细胞器,从而避免凋亡作用发生^[27]。

本研究发现,高水平的自噬标志物LC3B导致与放射和/或化学疗法的抗性显著相关。在我们的研究中增强的自噬是疾病进展的结果,而不是由其

他研究者报道的化学诱导^[26]。此外,本研究使用的细胞类型与其他研究中使用的细胞类型明显不同,因为GBM对化疗和放疗高度耐药。需要进一步的探究自噬标记物对星形胶质细胞的作用。本研究Beclin-1没有表现出类LC3B的特性,对于Beclin-1的分析还需进一步研究。

有研究指出,由于自噬能力下调,GBM中LC3B-II和Beclin-1的表达水平降低^[19]。与本研究结果一致,本研究还发现LC3B的高水平表达与不良预后相关。本研究结果表明,虽然没有统计学意义,自噬减少会导致更晚期的星形细胞瘤。自噬在肿瘤发生中的作用是复杂的^[27]。它一方面可以抑制肿瘤发生早期的肿瘤发展;另一方面自噬还可以促进已建立肿瘤的肿瘤进一步发展。本研究结果表明,高水平的LC3B表达或增强自噬与预后不良和自噬作为肿瘤启动子的作用相一致。

最近,GBM癌症干细胞已经被证明参与了肿瘤内皮的形成,增加了肿瘤的侵袭力,并且通过各种机制导致对放疗的抵抗。本研究结果表明CD133(癌症干细胞样细胞标志物)和LC3B的高水平表达是星形细胞瘤预后不良的指征。这些结果表明,星形细胞瘤癌症干细胞样细胞和增强的自噬可引起对放射疗法/化学疗法的抗性,并且针对星形细胞瘤中的癌症干细胞样细胞可提供可行的治疗方法。

参 考 文 献

- [1] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. Acta Neuropathol, 2016, 131(6):803-820.
- [2] El-Sayed M, Taha MM. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in astrocytoma: correlation with angiogenesis, tumor progression and survival[J]. Turk Neurosurg, 2011, 21(1):27-35.
- [3] N BN, Donson AM, Birks DK, et al. Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 expression is an Independent prognostic factor in pediatric pilocytic and pilomyxoid astrocytoma [J]. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2013, 72(5):442-449.
- [4] 王鹏,宋扬,高丽鹤,等. 肌醇六磷酸或(和)肌醇对多种癌细胞增殖影响[J]. 齐鲁医学杂志, 2016, 31(3):301-303, 306.
- [5] 吴安琪,曙光,王晶,等. 癌症干细胞特性及靶向治疗进展[J]. 转化医学电子杂志, 2017, 4(9):1-8.
- [6] 袁凡恩,陈谦学. 胶质瘤干细胞的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2016, 21(8):508-511.
- [7] 张亚,丁晓,陆海军. 恶性胶质瘤靶向治疗研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(5):350-356.

(下转第579页)

- [8] 陈志杰,石松生,陈春美.脑胶质瘤干细胞靶向免疫治疗研究进展[J].国际神经病学神经外科学杂志,2014,41(2):181-184.
- [9] 冯文之,陈扬,俞立.细胞自噬分子机制的进展[J].生命科学,2015,27(7):859-866.
- [10] 地里夏提·白克力,伊利夏提·肖开提,李学军.自噬在肿瘤耐药中的作用研究进展[J].国际药学研究杂志,2015,42(3):303-309+337.
- [11] White E. The role for autophagy in cancer[J]. Journal of Clinical Investigation,2015,125(1):42-46.
- [12] Kashima J,Shintani-ishida K,Nakajima M,et al. Immunohistochemical study of the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 in normal and steatotic human livers[J]. Hepatol Res,2014,44(7):779-787.
- [13] Tanida I, Ueno T, Uchiyama Y. A super-ecliptic, pHfluorin-mKate2,tandem fluorescent protein-tagged human LC3 for the monitoring of mammalian autophagy[J]. PLoS One, 2014, 9 (10):e110600.
- [14] Wei Y,Zou Z,Becker N,et al. EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression,tumor progression, and tumor chemoresistance[J]. Cell,2013,154(6):1269-1284.
- [15] Fu LL, Cheng Y, Liu B. Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology,2013,45(5):921-924.
- [16] Chen S,Jiang YZ,Huang L,et al. The residual tumor autophagy marker LC3B serves as a prognostic marker in local advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy[J]. Clin Cancer Res,2013,19(24):6853-6862.
- [17] Auffinger B,Tobias AL,Han Y,et al. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy[J]. Cell Death Differ,2014, 21(7):1119-1131.
- [18] Bao B,Ali S,Ahmad A,et al. Differentially expressed miRNAs in cancer-stem-like cells:markers for tumor cell aggressiveness of pancreatic cancer[J]. Stem Cells Dev,2014,23(16):1947-1958.
- [19] 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.
- [20] Melguizo C, Prados J, González B, et al. MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy [J]. J Transl Med,2012,10(1):250.
- [21] 张琼霞,王希成,陈树鹏,等. 干细胞标志物 ALDH1 与大样本乳腺癌患者的预后关系[J]. 临床医学工程,2016,23(12):1585-1587.
- [22] 李丽娟,温树信,王斌全,等. 肿瘤干细胞标记物 USP22 蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及预后分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,49(6):479-482.
- [23] 杨丽萍,侯俊德,段爱红,等. 肿瘤干细胞标志物 CD133 和 Nestin 在卵巢癌中的表达及意义[J]. 临床和实验医学杂志,2015,14(4):301-304.
- [24] 李式浩,徐培坤,李显雄,等. 术后辅助不同放化疗方案对高级别胶质瘤患者的预后分析[J]. 安徽医药,2017,21(10):1858-1860.
- [25] Mrugala MM. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma:a clinician's perspective[J]. Discov Med,2013,15 (83):221-230.
- [26] 张春,李清漪,董海影,等. PI3K/AKT/mTOR 信号通路在诱导胶质瘤细胞凋亡中的作用[J]. 中国新药杂志,2016,25(16):1909-1912.
- [27] 黄丽娟,王剑松,王海峰. 自噬机制在肿瘤化疗中的研究进展[J]. 医学与哲学:B,2017,38(02):70-72+90.