

自噬相关基因在乳腺癌 ET 方案新辅助化疗疗效预测中的作用*

李俊, 刘晓渝, 江歌丽, 何笑冬, 曹勇, 周鑫, 曾晓华[△]

(重庆市肿瘤研究所乳腺中心 400030)

摘要:目的 明确自噬相关基因在乳腺癌 ET 方案(表柔比星+多西紫杉醇)新辅助化疗疗效预测中的作用。方法 回顾性收集 41 例接受 ET 方案新辅助化疗患者化疗前的乳腺癌病理组织标本, 分别以蛋白质印迹法(Western blot)、实时荧光定量 PCR 及免疫组织化学检测各组织中自噬相关基因 Atg3 和 Beclin1 的表达情况, 并通过统计学 Fisher 确切概率法, 分析化疗前 Atg3 和 Beclin1 表达与化疗后疗效的关系。结果 经 Western blot、实时荧光定量 PCR 及免疫组织化学检测发现 41 例化疗前乳腺癌组织标本中有 24 例 Atg3 与 Beclin1 高表达, 其中化疗后有效者(完全缓解或部分缓解)23 例(95.8%), 无效者(疾病进展)1 例; 另 17 例乳腺癌组织 Atg3 与 Beclin1 化疗前无表达或低表达, 其中化疗后有效者(完全缓解或部分缓解)3 例(17.6%), 无效者(疾病稳定或疾病进展)14 例。化疗前 Atg3 与 Beclin1 高表达的患者化疗有效率明显高于无表达或低表达患者($P < 0.05$)。结论 Atg3 与 Beclin1 高表达可作为预测乳腺癌 ET 方案新辅助化疗疗效的指标之一。

关键词: 乳腺肿瘤; 自噬; 化学疗法, 辅助; ET 方案; Atg3; Beclin1

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)03-0337-03

The role of autophagy-related genes in the evaluation of therapeutic effect of ET regimen neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*

Li Jun, Liu Xiaoyu, Jiang Geli, He Xiaodong, Cao Yong, Zhou Xin, Zeng Xiaohua[△]

(Department of Breast Surgery, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

Abstract: Objective To identify the role of autophagy-related genes in prediction of therapeutic effect of ET regimen neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Methods Breast cancer tissues were retrospectively collected from 41 cases of breast cancer patients that treated by ET regimen neoadjuvant chemotherapy with different therapeutic effects. Expressions of Atg3 and Beclin1, and the autophagy-related genes, were detected by Western blot, Real-time PCR and immunohistochemistry in these tissues to observe their expressions before neoadjuvant chemotherapy. Statistical test was used to analyze the relationship between Atg3, Beclin1 expressions and therapeutic effects of ET regimen neoadjuvant chemotherapy. Results Western blot, Real-time PCR and immunohistochemistry revealed that expressions of Atg3 and Beclin1 were up-regulated in 24 breast cancer tissues before neoadjuvant chemotherapy, including 23 cases of complete response(CR) or partial response (PR) (95.8%) and 1 case of progressive disease (PD). Atg3 and Beclin1 were not expressed or lowly expressed in the other 17 cases, including 3 cases of CR or PR (17.6%) and 14 cases of no change and PD. The effective rate of ET regimen neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients with over expression of Atg3 and Beclin1 was significantly higher than those with low expression or without expression of Atg3 and Beclin1 ($P < 0.05$). Conclusion Over expression of Atg3 and Beclin1 could be new indicators for therapeutic effect of ET regimen neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.

Key words: breast neoplasms; autophagy; chemotherapy, adjuvant; ET regimen; Atg3; Beclin1

新辅助化疗目前是治疗局部进展期乳腺癌的标准方案之一, 可缩小肿瘤, 便于手术, 并可根据化疗后临床和病理上的反应判断预后, 为进一步选择合适的治疗方法提供依据^[1]。然而新辅助化疗如果无效则可能延误手术治疗时机, 因此, 寻找合适的指标评价新辅助化疗的疗效, 对于早期改变治疗方案, 及时控制病情发展尤为重要。其中 ET 方案(表柔比星+多西紫杉醇)作为乳腺癌新辅助化疗的标准化疗方案之一, 目前仍缺乏有效的疗效评价指标以指导进一步治疗方案的选择。研究发现自噬相关基因 Atg3 与 Beclin1 的表达与肝癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤的预后密切相关, 是重要的预后评价指标之一^[2-5]。本研究检测经 ET 方案行新辅助化疗前乳腺癌组织中

Atg3 与 Beclin1 的表达, 分析其与化疗后疗效间的差异, 评价 Atg3 与 Beclin1 在乳腺癌 ET 方案新辅助化疗疗效预测中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集重庆市肿瘤研究所乳腺科 2011 年 6 月至 2013 年 1 月收治的 41 例经粗针穿刺活检证实, 以及通过腹部彩超、胸片和骨扫描排除远处转移的临床 III 期女性乳腺癌患者的组织标本。所有患者均有临床可测量的病灶、无其他恶性肿瘤病史、入组前均未接受任何抗癌治疗、一般情况良好, 卡氏(Karnofsky)评分为 80 分以上; 血常规、肝肾功能、心肌酶谱和肌钙蛋白正常, 心电图正常, 心脏射血分数大于 55%。

1.2 方法

1.2.1 主要材料与试剂 蛋白裂解液 M-PER 购自美国 Thermo Pierce 公司。Atg3 和 Beclin1 一抗购自美国 Abcam 公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗及相应的二抗和链霉亲和素-生物素复合物(SABC)免疫组织化学试剂盒及 DAB 显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。RNA 抽提试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司,实时定量试剂盒购自日本 TaKaRaBio 株式会社。Atg3、Beclin2 与 β -actin RNA 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 治疗方法 所有患者均签署知情同意书,接受 4 周期 ET 方案新辅助化疗:多西紫杉醇 75 mg/m²,第 1 天持续 3 h 静脉滴注;表柔比星 90 mg/m²,第 2 天静脉滴注。化疗方案每 3 周重复 1 次,4 周期后评价疗效,后续治疗方案均按照中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2013 版)进行^[6]。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 测量 将收集的组织标本洗涤、剪碎、研磨,以冷 PBS 漂洗 2 次后,加入 1 mL Trizol,按照 Trizol 一步法提取组织总 RNA,以酶标仪测定 RNA 纯度和含量。按照逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA,实时荧光定量 PCR 反应按照试剂盒说明书操作。Atg3 引物序列为:上游序列 5'-GGA AGA AGA TGA AGA TGA A-3',序列长度 19 bp;下游序列 3'-CAT AAT CGT GGA GTC TGG TA-5'^[2],序列长度 20 bp。Beclin1 引物序列为:上游序列 5'-CCT CCT GTG TCT TCA ATC TT-3',序列长度 20 bp;下游序列 3'-GCT GCC GTT ATA CTG TTC T-5',序列长度 19 bp。 β -actin 引物序列为:上游序列 5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3',序列长度 23 bp;下游序列 3'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-5',序列长度 24 bp。以 SYBR Green I 法进行实时荧光定量 PCR 反应,每样本重复 3 次,2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行信使 RNA (mRNA)水平相对定量。

1.2.4 蛋白质印迹法(Western blot)测量 将收集的组织标本洗涤、剪碎、研磨后加入蛋白裂解液提取总蛋白。蛋白定量后,煮沸变性后按 30 μ g/孔上样,经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至聚偏二氯乙烯膜(PVDF 膜),以 5%脱脂奶粉封闭 60 min,分别加入 Atg3(1:500)和 Beclin1(1:500)及 GAPDH(1:1 000)一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h 后,ECL 化学发光,以 Bio-Rad 荧光成像系统显影。目的蛋白表达以 GAPDH 作为参照相对定量。

1.2.5 免疫组织化学染色及结果判断 以 SABC 法进行上述组织标本免疫组织化学染色。组织石蜡切片常规脱蜡至水后,以 3%过氧化氢浸泡 60 min 以灭活内源性过氧化物酶,洗涤后切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液中加热至 95 $^{\circ}$ C 20 min 行热修复抗原。自然冷却后以 5%牛血清清蛋白封闭切片标本 60 min,加入 Atg3 一抗(1:200)和 Beclin1 一抗(1:200),4 $^{\circ}$ C 湿盒内孵育过夜。再滴加生物素化二抗室温孵育 20 min 后加入 SABC 反应液室温孵育 20 min,最后以 DAB 显色剂显色,脱水,透明,封片,显微镜观察。Atg3 和 Beclin1 阳性时为乳腺癌细胞的细胞质呈黄色-棕褐色颗粒,采用染色强度与阳性细胞的百分率相结合的判定标准。染色强度:不着色为 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,黄褐色 3 分。阳性细胞所占百分比:阳性细胞数小于 5%计为 0 分,5%~<30%计为 1 分,30%~<

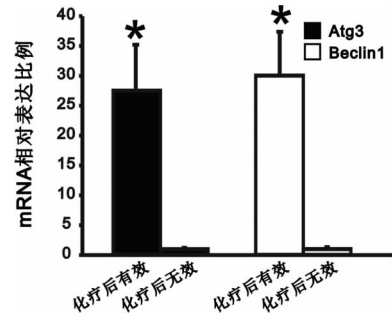
60%计为 2 分, \geq 60%计为 3 分。两者乘积为染色总分,阴性(-):0 分,弱阳性(+):1~4 分,中度阳性(++):5~8 分,强阳性(+++):9~12 分^[7]。

1.2.6 化疗疗效评价 化疗前、化疗 2 周期,以及化疗 4 周期后均分别采用乳腺磁共振成像(MRI)评估乳腺病灶,根据实体瘤疗效反应评价标准(RECIST)进行疗效评价^[8],分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)、疾病进展(PD)和疾病稳定(NC),CR+PR 率为总有效率,手术标本中原发病灶和淋巴结均无肿瘤病灶残留或仅有导管原位癌残留则判定为病理完全缓解(PCR)。26 例患者达 CR 或 PR,15 例患者为 NC 或 PD。

1.3 统计学处理 应用 SPSS11.0 统计软件对数据进行统计学处理,计数资料用率表示,组间比较用 Fisher 确切概率法检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同疗效乳腺癌组织化疗前 Atg3 与 Beclin1 mRNA 的表达 在 26 例化疗后有效达 CR 或 PR 的患者中,有 23 例患者化疗前乳腺癌组织中 Atg3 与 Beclin1 mRNA 高表达,仅 3 例呈明显低表达或不表达;在 15 例化疗无效为 NC 或 PD 的患者中,有 14 例患者化疗前乳腺癌组织 Atg3 与 Beclin1 mRNA 低表达或不表达,仅 1 例高表达,见图 1。

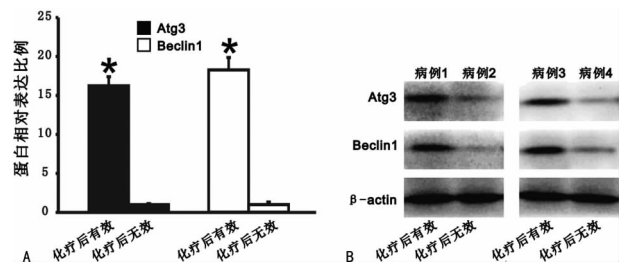


*: $P < 0.05$,与化疗后比较。

图 1 不同疗效患者化疗前乳腺癌组织中 Atg3 与 Beclin1 mRNA 表达相对比例

2.2 不同疗效乳腺癌组织化疗前 Atg3 与 Beclin1 蛋白的表达

Western blot 也显示 26 例化疗后有效达 CR 或 PR 的乳腺癌患者中,有 23 例化疗前 Atg3 与 Beclin1 蛋白在乳腺癌组织中呈现高表达,仅 3 例呈现低表达或无表达;另 15 例化疗后无效为 NC 或 PD 的患者中,有 14 例 Atg3 与 Beclin1 蛋白在化疗前为低表达或无表达,仅 1 例呈现高表达,见图 2。



A: 不同疗效患者化疗前乳腺癌组织中 Atg3 与 Beclin1 蛋白表达相对比例;B: 代表性病例的 Atg3 与 Beclin1 Western blot 结果; *: $P < 0.05$,与化疗后比较。

图 2 不同疗效患者化疗前乳腺癌组织中 Atg3 与 Beclin1 蛋白表达相对比例

2.3 免疫组织化学检测不同疗效乳腺癌组织化疗前 Atg3 与 Beclin1 的表达 在化疗后有效(CR 或 PR)的 26 例乳腺癌患者中,有 23 例 Atg3 与 Beclin1 在化疗前癌细胞质中呈现++

或 +++,仅 3 例表现为+或-;在化疗后无效(NC 或 PD)的 15 例患者中,有 14 例患者化疗前 Atg3 与 Beclin1 在癌细胞质中呈现+或-,仅 1 例表现为++ ,见图 3。

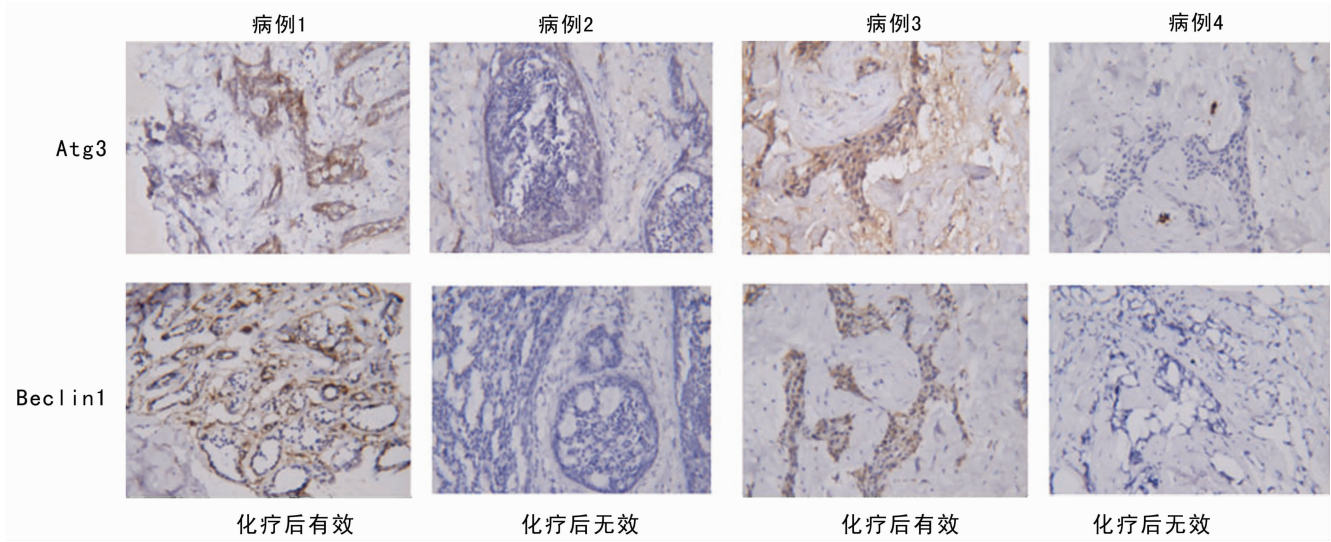


图 3 不同疗效患者化疗前乳腺癌组织中 Atg3 与 Beclin1 免疫组织化学染色

2.4 化疗前 Atg3 与 Beclin1 表达与化疗后不同疗效的关系 依据上述经 ET 方案新辅助化疗后不同疗效例数与化疗前乳腺癌组织中 Atg3 与 Beclin1 不同表达例数见表 1。化疗前 Atg3 与 Beclin1 高表达组总有效率为 95.8%(23/24),低表达和不表达组的总有效率为 17.6%(3/17),化疗前 Atg3 与 Beclin1 高表达组的乳腺癌化疗有效率高于低表达和不表达组 ($P<0.05$)。

表 1 化疗前 Atg3 与 Beclin1 不同表达组与化疗后有效率比较 (n)

组别	CR+PR (n=26)	SD+PD (n=15)	Fisher 值	P
高表达组	23	1	26.22	<0.05
低表达或不表达组	3	14		

3 讨 论

前期研究发现在乳腺癌患者接受 ET 方案新辅助化疗前存在多种基因的表达差异,其中自噬相关基因 Atg3 与 Beclin1 的表达差异尤为显著。因此分析化疗前相关基因表达变化与化疗疗效的关系,有助于发现化疗方案疗效预测指标。近来研究发现在肝癌中,自噬基因 Atg3 的过表达将通过上皮间质转化促进癌细胞的侵袭和转移^[2];另一方面 Beclin1 的高表达可抵抗恶性细胞的凋亡^[9-11],因而 Atg3 与 Beclin1 的表达可促进恶性肿瘤细胞无限增殖与侵袭转移等恶性行为。ET 方案中,多西紫杉醇类可促进细胞微管聚合,抑制微管解聚,使纺锤体功能失常,从而抑制细胞增殖,微管蛋白的聚合、解聚也是上皮间质转化过程的重要步骤^[12-14]。因而表明多西紫杉醇类可能通过抑制微管蛋白功能干扰 Atg3 引导的上皮间质转化过程,达到抗癌作用。而表柔比星类药物则通过直接嵌入细胞 DNA 核碱基对之间,干扰转录过程,阻止 mRNA 的形成,从而抑制 DNA 和 RNA 的合成,同时抑制拓扑异构酶 II,也抑制 DNA

的合成,进而可能拮抗 Beclin1 介导的抗凋亡作用。

本研究通过回顾性收集、检测经 ET 方案新辅助化疗前的乳腺癌患者病理组织标本中 Atg3 和 Beclin1 的表达,研究结果表明 ET 方案可能拮抗 Atg3 与 Beclin1 介导的细胞恶性行为而发挥抗癌作用产生疗效,因此化疗前 Atg3 与 Beclin1 的高表达可能预示经 ET 方案新辅助化疗有效。

基于雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体的乳腺癌分子分型为乳腺癌患者正确接受内分泌治疗或分子靶向治疗发挥了重要的决定性作用^[15]。然而目前对于化疗方案的选择主要依赖于大规模临床试验,尚无明确客观分子选择机制。本研究发现,在 Atg3 和 Beclin1 过表达的患者,接受 ET 方案新辅助化疗后有效率更高,从而为患者接受 ET 方案新辅助化疗提供了新的导向性和理论依据。

参考文献:

[1] Connolly RM, Stearns V. Current approaches for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 717(1/3):58-66.

[2] Li JQ. Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(6):1343-1351.

[3] Song JX. Autophagy in hypoxia protects cancer cells against apoptosis induced by nutrient deprivation through a Beclin1-dependent way in hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(11):3406-3420.

[4] Apel A, Herr I, Schwarz H, et al. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy[J]. Cancer Res, 2008, 68(5):1485-1494.

[5] Chen Z, Li Y, Zhang C, et al. Downregulation of Beclin 1 and impairment of autophagy in a small population of colorectal cancer[J]. Dig Dis Sci, 2013, (下转第 342 页)

- [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012, 32 (2): 247-251.
- [6] 徐晓英, 汤春辉, 薛晓玲. 高危型 HPV、p16、COX-2 在宫颈癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医学, 2011, 40(12): 1199-1201, 1204.
- [7] Wang D, Wu M, Feng FZ, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios do not predict survival in patients with cervical cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and radical hysterectomy [J]. Chin Med J, 2013, 126(8): 1464-1468.
- [8] Chen HW, Liu SS, Miao LF, et al. Inhibitory effect of lanthanum chloride on migration and invasion of cervical cancer cells[J]. J Rare Earth, 2013, 31(1): 94-100.
- [9] Liu N, Zhao LJ, Li XP, et al. Histone deacetylase inhibitors inducing human cervical cancer cell apoptosis by decreasing DNA-methyltransferase 3B [J]. Chin Med J, 2012, 125(18): 3273-3278.
- [10] Ma YY, Cheng XD, Zhou CY, et al. Value of P16 expression in the triage of liquid-based cervical cytology with atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions [J]. Chin Med J, 2011, 124(16): 2443-2447.
- [11] Li B, Li W, Sun YC, et al. Nerve plane-sparing radical hysterectomy: a simplified technique of nerve-sparing radical hysterectomy for invasive cervical cancer [J]. Chin Med J, 2011, 124(12): 1807-1812.
- [12] Chadza E, Chirwa E, Maluwa A, et al. Factors that contribute to delay in seeking cervical cancer diagnosis and treatment among women in Malawi [J]. Health, 2013, 4(11): 1015-1022.
- [13] Wu S, Lu S, Tao H, et al. Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis of early stage cervical cancer [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011, 31(1): 114-119.
- [14] Li K, Jin X, Fang Y, et al. Correlation between physical status of human papilloma virus and cervical carcinogenesis [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012, 32(1): 97-102.
- [15] 李婵玉. MMP-9 及其相关因子与宫颈癌 [J]. 重庆医学, 2012, 41(33): 3545-3547.

(收稿日期: 2014-09-08 修回日期: 2014-11-18)

(上接第 339 页)

- 58(10): 2887-2894.
- [6] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2013 版) [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 637-693.
- [7] 何双, 吴淑华, 胡金龙, 等. 自噬调控因子 beclin1 及 mTOR 在大肠腺瘤癌变过程中的表达及意义 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(7): 920-926.
- [8] Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(3): 205-216.
- [9] 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.
- [10] Li X, Yan J, Wang L, et al. Beclin1 inhibition promotes autophagy and decreases gemcitabine-induced apoptosis in MiaPaca2 pancreatic cancer cells [J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1): 26.
- [11] Wang W, Fan H, Zhou Y, et al. Knockdown of autophagy-related gene BECLIN1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in the A549 human lung cancer cell line [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(5): 1501-1505.
- [12] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2): 97-110.
- [13] Roxanis I. Occurrence and significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer [J]. J Clin Pathol, 2013, 66(6): 517-521.
- [14] Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression [J]. Curr Opin Oncol, 2013, 25(1): 76-84.
- [15] 吴建南, 李顺荣, 顾然, 等. 乳腺癌分子分型在新辅助化疗疗效和预后中的预测作用 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2011, 32(3): 383-388, 420.

(收稿日期: 2014-09-24 修回日期: 2014-11-22)

更正说明

《重庆医学》2014 年 12 月 43 卷 35 期 4705-4707 页, “霍奇金淋巴瘤细胞 SHP1 表达与 CD99 表达的关系”一文, 所有费用及课题来源于该文第三作者吴自劼的国家自然科学基金(81071659), 由于第一作者雷翔慧的疏忽导致遗漏了吴自劼为该文共同通讯作者。经编辑部多方核实, 以上情况属实。故特此更正说明, 补充吴自劼为该文共同通讯作者, Tel: 13533798728, E-mail: hailian@fimmu.com.

重庆医学编辑部
2015 年 1 月 20 日