

# 自噬相关蛋白 LC3-II 在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义

于 婷<sup>1,2</sup>, 赵洪萍<sup>2</sup>, 周 颖<sup>2</sup>, 赵卫东<sup>2</sup>, 刘培淑<sup>1</sup>

**摘要** 目的 本研究检测微管轻链 I 蛋白 3-II 型(LC3-II)在不同卵巢肿瘤组织中的表达情况,探讨其与浆液性卵巢癌及黏液性卵巢癌发生、发展的相关性和意义。方法 选取 204 例上皮性卵巢肿瘤标本,其中,卵巢浆液性囊腺瘤 46 例,交界性浆液性肿瘤 28 例,浆液性囊腺癌 40 例,黏液性囊腺瘤 32 例,交界性黏液性囊腺瘤 30 例,黏液性囊腺癌 28 例,另选取正常卵巢上皮组织 28 例作为对照。使用 SP 法检测正常卵巢上皮组织、上皮性卵巢肿瘤组织中 LC3-II 的表达,并结合浆液性癌、黏液性癌临床病理因素进行分析。结果 ① 正常卵巢上皮中 LC3-II 无表达,卵巢良性浆液性囊腺瘤、交界性浆液性肿瘤及浆液性癌中 LC3-II 的阳性率分别为 4.5%、71.0%、95.0%,交界性浆液性肿瘤和浆液性癌中 LC3-II 的表达明显高于良性浆液性囊腺瘤,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。卵巢良性黏液性囊腺瘤、交界性黏液性肿瘤及黏液性癌中 LC3-II 的阳性率分别为 6.7%、66.7%、92.9%,交界性浆液性肿瘤和浆液性癌中 LC3-II 的表达明显高于良性浆液性囊腺瘤,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); ② 在 40 例卵巢浆液性癌、28 例卵巢黏液性癌中,LC3-II 表达与患者年龄、FIGO 分期及病理学分级等临床病理特征均无关。结论 LC3-II 在卵巢上皮性交界性肿瘤、癌中表达增高,自噬活性增强,可能与卵巢上皮性恶性肿瘤的进展有关。**关键词** 卵巢肿瘤;自噬;LC3-II

中图分类号 R 737.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0628-04

卵巢恶性肿瘤是女性生殖器官常见的三大恶性肿瘤之一,因缺乏早期肿瘤标志物及预防检测方法,且晚期病例缺乏有效治疗手段,其致死率居女性生殖系统肿瘤首位。过去 50 年,美国卵巢癌患者 5 年生存率约 40%<sup>[1]</sup>。卵巢上皮性肿瘤占原发卵巢肿瘤的 50%~70%,占卵巢恶性肿瘤的 85%~90%,其中浆液性卵巢癌占上皮性卵巢癌的 75%,黏液性囊腺癌占上皮性卵巢癌的 20%,术后复发率高,预后

差,是晚期患者死亡的主要肿瘤类型。有研究<sup>[2]</sup>表明,自噬活性的改变与肿瘤发生、发展有关,诱导自噬细胞死亡已成为杀死肿瘤细胞的新策略。微管轻链 I 蛋白 3-II 型(microtubule-associated protein light chain, LC3-II)是特异表达于自噬小体膜的分子标识,在自噬晚期阶段表达,更适合自噬的检测<sup>[3]</sup>,该研究使用免疫组化法检测其在不同病变卵巢组织中的表达情况,并结合临床病理资料进行分析,为了解卵巢上皮性癌发病机制及分子靶向治疗在卵巢癌中应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2011 年 1 月~2012 年 12 月安徽医科大学附属省立医院病理科确诊的 204 例上皮性卵巢肿瘤标本,其中卵巢浆液性囊腺瘤 46 例,交界性浆液性肿瘤 28 例,浆液性囊腺癌 40 例,黏液性囊腺瘤 32 例,交界性黏液性囊腺瘤 30 例,黏液性囊腺癌 28 例,另选取正常卵巢上皮组织 28 例作为对照。所有患者临床病理资料存档完整。患者年龄 19~79(50.3±5.9)岁。上皮性卵巢癌共 68 例,按国际妇产科联盟(FIGO)2006 年手术病理分期标准: I~II 期 34 例, III~IV 期 34 例;按病理分化程度分:低分化 40 例,中分化 10 例,高分化 18 例。标本均由两位病理医师分别判断病理类型和组织学分型。

**1.2 试剂** LC3-II 兔抗人单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;免疫组化 SP 试剂盒、抗原修复液、DAB 显色及辣根过氧化物酶标记 IgG 的通用型二抗均购自北京中杉金桥生物技术公司。

**1.3 方法** 常规 4 μm 厚连续切片,免疫组化 SP 法按试剂盒说明书进行操作。石蜡切片常规脱蜡、脱苯、水化,枸橼酸盐热修复,自然冷却后氢氧化氢修复封闭。滴加一抗 LC3-II(稀释比 1:50)4℃冷藏过夜,复温加二抗,DAB 染色,苏木精复染、脱水、透明、封片、观察。实验中用已知阳性切片作阳性对照,使用 PBS 代替一抗作阴性对照。

**1.4 结果判读和评分** LC3-II 着色于细胞质,呈棕黄色或棕褐色颗粒。采用双盲法随机在光学显微镜

2015-03-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81001168、81272881);安徽省科技厅年度重点科研项目(编号:1301043053)

作者单位:<sup>1</sup>山东大学附属齐鲁医院妇产科,济南 250012

<sup>2</sup>安徽医科大学附属省立医院妇产科,合肥 230001

作者简介:于 婷,女,主治医师,硕士研究生;

刘培淑,女,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: liupeishu2010@gmail.com

下观察 5 个高倍(×400)视野中肿瘤细胞阳性着色的分布及强度。每个视野计数 100 个细胞,按染色强度评分,与背景染色强度对比 0 分:无着色;1 分:浅黄色;2 分:棕黄色;3 分:棕褐色。按阳性细胞数百分比评分 0 分:无阳性细胞数;1 分:阳性细胞数百分比 ≤ 10%;2 分:阳性细胞数百分比 10% ~ 50%;3 分:阳性细胞数百分比 50% ~ 80%;4 分:阳性细胞数百分比 > 80%;将染色强度、阳性细胞数评分相乘计算总分, < 1 分为阴性, 1 ~ 4 分为弱阳性(+) 5 ~ 12 分为阳性(++)

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。LC3-II 在正常卵巢上皮组织、卵巢上皮性肿瘤间表达差异及 LC3-II 的表达与卵巢浆液性癌、卵巢黏液性癌患者临床病理特征之间的关系均采用  $\chi^2$  检验中的 Pearson Chi-Square 法计算。

**2 结果**

**2.1 LC3-II 在正常卵巢上皮组织、卵巢浆液性肿瘤、卵巢黏液性肿瘤中的表达评分情况** LC3-II 在正常卵巢上皮组织、卵巢良性浆液性囊腺瘤、卵巢良性黏液性囊腺瘤中几无表达,在卵巢交界性浆液性肿瘤、浆液性癌;卵巢交界性黏液性肿瘤和黏液性癌中 LC3-II 着色于细胞质,呈棕黄色或棕褐色颗粒。将良性浆液性瘤、交界性浆液性瘤、浆液性癌设为浆液性肿瘤一组;将良性黏液性瘤、交界性黏液性瘤、黏液性癌设为黏液性肿瘤一组。LC3-II 表达评分在卵巢浆液性肿瘤一组中  $P < 0.01$ ;黏液性肿瘤一组中  $P < 0.01$ 。见图 1、2、3。

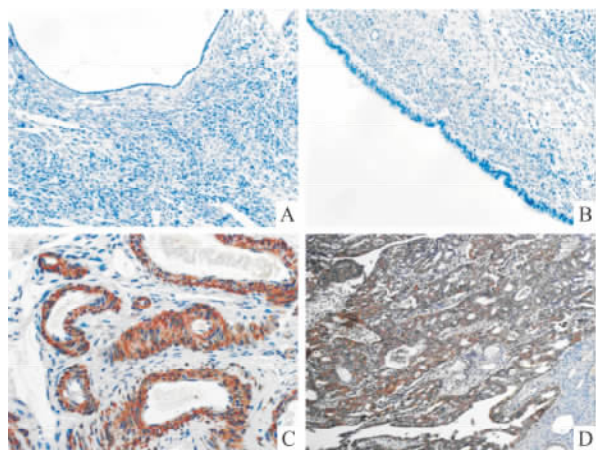


图 1 LC3-II 在正常卵巢上皮组织和卵巢浆液性肿瘤中的表达 SP × 100  
A: 正常卵巢上皮组织; B: 浆液性囊腺瘤; C: 交界性浆液性囊腺瘤; D: 浆液性囊腺癌

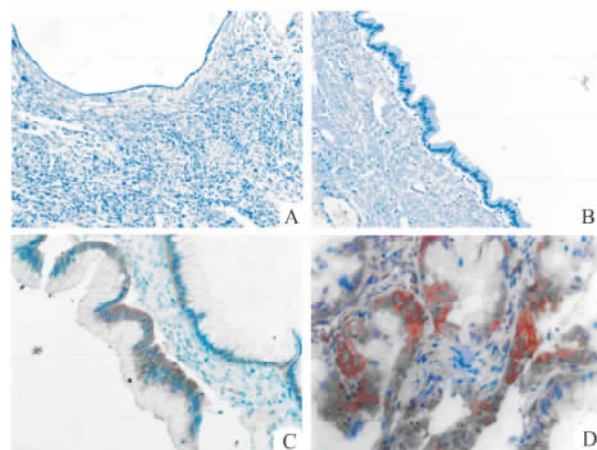


图 2 LC3-II 在正常卵巢上皮组织和卵巢黏液性肿瘤中的表达 SP × 100  
A: 正常卵巢上皮组织; B: 黏液性囊腺瘤; C: 交界性黏液性囊腺瘤; D: 黏液性囊腺癌

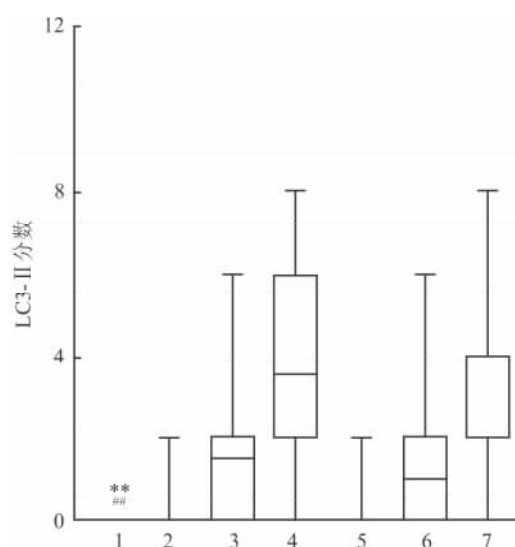


图 3 LC3-II 在卵巢组织中的表达评分情况

1: 正常卵巢上皮组织; 2: 卵巢良性浆液性癌; 3: 卵巢交界性浆液性癌; 4: 卵巢浆液性癌; 2、3、4 为浆液性肿瘤组 5: 卵巢良性黏液性癌; 6: 卵巢交界性黏液性癌; 7: 卵巢黏液性癌; 5、6、7 为黏液性肿瘤组; 与浆液性肿瘤组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与黏液性肿瘤组比较: ###  $P < 0.01$

**2.2 LC3-II 在正常卵巢上皮组织和卵巢浆液性肿瘤、卵巢黏液性肿瘤中的表达率情况** 正常卵巢上皮组织中 LC3-II 无表达。卵巢良性浆液性瘤、交界性浆液性瘤、浆液性癌为浆液性肿瘤一组, LC3-II 的阳性率分别为 4.5%、71.0%、95.0%,交界性浆液性肿瘤和浆液性癌中 LC3-II 的表达明显高于良性浆液性囊腺瘤,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。良性黏液性瘤、交界性黏液性瘤、黏液性癌为黏液性肿瘤一组, LC3-II 的阳性率分别为 6.7%、66.7%、

92.9% ,交界性浆液性肿瘤和浆液性癌中 LC3-II 的表达明显高于良性浆液性囊腺瘤 ,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 LC3-II 在卵巢组织中的表达 [n( % )]

项目	例数 (n)	LC3-II		
		-	+	++
正常卵巢	28	28(100.0)	0(0)	0(0)
良性浆液性瘤	46	44(95.7)	2(4.3)	0(0)
交界性浆液性瘤	28	8(28.6)	16(57.1)	4(14.3)
浆液性癌	40	2(5.0)	24(60.0)	14(35.0)
良性黏液性瘤	32	30(93.7)	2(6.3)	0(0)
交界性黏液性瘤	30	10(33.3)	16(53.3)	4(13.4)
黏液性癌	28	2(7.2)	20(71.4)	6(21.4)

**2.3 LC3-II 表达与浆液性癌、黏液性癌患者临床病理特征的关系** 在 40 例卵巢浆液性癌、28 例卵巢黏液性癌中 ,LC3-II 表达与患者年龄、FIGO 分期及病理学分级等临床病理特征均无关。见表 2。

表 2 LC3-II 表达与卵巢浆液性癌、黏液性癌患者临床参数的关系 (n)

项目	n	卵巢浆液性癌				P 值	n	卵巢黏液性癌				P 值
		-	+	++	+++			-	+	++	+++	
年龄(岁)												
≤50	16	4	10	2	0.150	20	2	16	2	0.055		
>50	24	10	14	0		8	0	4	4			
FIGO												
I + II	14	0	10	4	0.407	20	0	16	4	0.055		
III + IV	26	2	14	10		8	2	4	2			
病理学分级												
高	4	0	2	2	0.490	14	2	8	4	0.312		
中	4	0	4	0		6	0	6	0			
低	32	2	18	12		8	0	6	2			

**3 讨论**

自噬 ,为真核细胞所特有 ,指当机体细胞处于营养缺乏等生理情况或暴露于低氧、辐射、细胞毒等压力环境时 ,为维持生存所需的基础代谢水平 ,细胞形成自噬小体 ,并通过自噬小体与溶酶体的融合 ,利用溶酶体酶将细胞内的细胞质、蛋白质、大分子物质消化降解 ,使其循环利用的生命现象<sup>[4-5]</sup>。自噬对细胞生长发育、成熟分化及死亡起重要调控作用 ,与包括肿瘤在内的多种人类疾病相关<sup>[6]</sup>。

微管轻链 I 蛋白 3 ( the microtubule-associated protein light chain 3 ,LC3) ,主要分为两种亚型: I 型和 II 型。当细胞没有发生自噬时 ,细胞内合成的 LC3 经过加工成为胞质可溶性 I 型 LC3 ,常规表达。

当机体本身发生自噬时 ,I 型 LC3 经过泛素样加工和修饰过程 ,与存在自噬体膜表面的磷脂酰乙醇胺结合 ,形成 LC3-PE ,即 LC3-II ,定位于自噬体膜的内外表面<sup>[7-8]</sup>。由于 LC3-II 在自噬晚期阶段表达 ,因此 ,更适合自噬的监测 ,主要反映细胞内自噬体数量 ,与自噬活性密切相关。

本组实验中 ,LC3-II 在正常卵巢上皮不表达 ,卵巢浆液性、黏液性肿瘤中 ,良性几无表达 ,交界性及癌中表达明显高于正常卵巢上皮及良性肿瘤;癌中表达明显高于交界性肿瘤 ,表明浆液性、黏液性卵巢上皮肿瘤交界性、癌自噬活性显著增加。提示上调自噬可能更有利于卵巢上皮恶性肿瘤细胞在压力环境下的生存 ,致大部分卵巢上皮性肿瘤在经典的外科手术及紧跟其后的紫杉醇、铂类化疗的治疗后出现耐药 ,使复发率及死亡率居高不下。

自噬对肿瘤的发生、发展具有双向作用 ,即可限制肿瘤的起始发生 ,也可促进肿瘤的形成和进展。即使同为妇科肿瘤 ,自噬在肿瘤发生、发展中所起到的作用也是不同的。自噬具有维持细胞完整和稳定基因组的作用 ,在肿瘤形成早期 ,自噬水平的降低可能增加 DNA 突变的可能 ,从而促进细胞增殖<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>发现 Beclin 1 和 LC3 在 I-II 分期( FIGO 标准)的宫颈鳞癌的表达水平明显低于在正常宫颈组织中的表达 ,这表明在宫颈鳞癌的形成早期 ,自噬具有抑制肿瘤发展的作用。在肿瘤进展过程中 ,血管机能不全引发的葡萄糖、氧过消耗 ,致活性氧产量的增加 ,肿瘤细胞外酸中毒 ,最终导致自噬在肿瘤微环境增强<sup>[11]</sup>。此时的肿瘤细胞依赖自噬作用清除细胞内毒性物质、循环再利用营养物质来延长肿瘤的生存;同时这种保护性机制使肿瘤细胞成功应对细胞毒性化疗药物 ,致使肿瘤耐药<sup>[12]</sup>。有研究<sup>[13]</sup>显示 ,Beclin 1 和 LC3 在子宫内膜癌中表达上调 ,诱导自噬 ,提示自噬与子宫内膜癌的发展及不良预后有关系 ,并且在低氧或营养缺乏的条件下 ,自噬在子宫内膜癌中可能作为一种保护性机制促进癌症发展。当然 ,某些情况下过度自噬肿瘤会发生自噬性程序死亡 ,即所谓的 II 型程序性细胞死亡 ,有利于增强化疗药的细胞毒性效应 ,这一现象有利于癌症的治疗<sup>[14]</sup>。

自噬对肿瘤起抑制或促进作用 ,取决于组织类型、发展阶段 ,涉及的突变及肿瘤微环境的改变。针对自噬可能是一个战略性对抗卵巢癌的新型疗法。

然而,以自噬为基础的疗法需严格取决于在肿瘤细胞中正在进行的实际自噬水平,这可能受基因突变、肿瘤微环境的影响。揭示自噬相关基因的临床意义,明确自噬失调和表观遗传因素,有望为卵巢癌症开辟新的诊断和治疗方法。

### 参考文献

- [1] Siegel R, Naishadha D, Jemal A, et al. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11–30.
- [2] Mathew R, White E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night [J]. *Curr Opin Genet*, 2011, 21(1): 113–9.
- [3] 周颖,程勇,吴大保,等. 自噬与肿瘤 [J]. *癌症进展*, 2013, 11(3): 144–7.
- [4] Wu W K, Coffelt S B, Cho C H, et al. The autophagic autophagy in cervical cancer—an emerging therapeutic target paradox in cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2012, 31(8): 939–53.
- [5] Choi A M, Ryter S W, Levine B. Autophagy in human health and disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(7): 651–62.
- [6] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer [J]. *Net Rev Cancer*, 2007, 7(12): 961–7.
- [7] de Haan C A, Molinari M, Reggiori F. Autophagy-independent LC3 function in vesicular traffic [J]. *Autophagy*, 2010, 6(7): 994–6.
- [8] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 77–88.
- [9] De Marco C, Rinaldo N, Bruni P, et al. Multiple genetic alterations within the PI3K pathway are responsible for AKT activation in patients with ovarian carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55362.
- [10] Zhu W, Pan X, Li F, et al. Expression of Beclin 1 and LC3 in FIGO stage I–II cervical squamous cell carcinoma and relationship to survival [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(5): 1653–9.
- [11] Bensaad K, Cheung E C, Vousden K H. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy [J]. *Embo J*, 2009, 28(19): 3015–26.
- [12] Fels D R, Ye J, Segan A T, et al. Preferential cytotoxicity of bortezomib toward hypoxic tumor cells *via* overactivation of endoplasmic reticulum stress pathways [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(22): 9323–30.
- [13] Sivridis E, Giatromanolaki A, Liberis V, et al. Autophagy in endometrial carcinomas and prognostic relevance of ‘stone-like’ structures (SLS): what is destined for the atypical endometrial hyperplasia? [J]. *Autophagy*, 2011, 7(1): 74–82.
- [14] Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling [J]. *Biochem J*, 2012, 441(2): 523–40.

## Expression and clinical significance of autophagy-related LC3-II in epithelial ovarian cancer

Yu Ting<sup>1,2</sup> Zhao Hongping<sup>2</sup> Zhou Ying<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Gynecology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012; <sup>2</sup>Dept of Gynecology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate the expression of microtubule-associated protein light chain 3-II (LC3-II) in the epithelial ovarian carcinoma and explore their correlations to the tumorigenesis and development of epithelial ovarian carcinoma. **Methods** 204 specimens with different-type epithelial ovarian tumors, including 46 with serous cystadenoma, 28 with borderline serous cystadenoma, 40 with serous cystadenocarcinoma, 32 with mucinous cystadenoma, 32 with borderline mucinous cystadenoma, 28 with mucinous cystadenocarcinoma, were selected in our study. Immunohistochemistry was employed to detect the expression of LC3-II. The correlations between expression of LC3-II and both the pathological features and clinical manifestations of 68 epithelial ovarian cancer patients were analyzed. **Results** The positive rates of LC3-II were significantly higher in epithelial ovarian carcinoma and borderline ovarian tumors than benign epithelial ovarian tumors. (In ovarian serous tumor, 95% and 71% vs 4.5%,  $P < 0.01$ ; in ovarian mucinous tumor, 92.9% and 66.7% vs 6.7%,  $P < 0.01$ ) ② In the serous cystadenocarcinoma and mucinous cystadenocarcinoma, the expression of LC3-II was not correlated to age, FIGO stage and histological grade. **Conclusion** Expression of LC3-II is up-regulated in epithelial ovarian cancer tissues. The increase of autophagic capacity may relate to the development of epithelial ovarian cancer.

**Key words** ovarian neoplasm; autophagy; LC3-II