

自噬相关基因 *Beclin 1* 与肿瘤

赵剑虹 万小云 谢幸

【摘要】 自噬性细胞死亡是一种不同于凋亡、不依赖于 caspase 的程序性细胞死亡。研究发现自噬活性的变化、自噬性细胞死亡与恶性肿瘤的发生、发展有关。某些癌基因、抑癌基因参与了自噬活性的调节,其中对 *Beclin1* 研究较多,它作为自噬相关基因参与调节自噬活性,从而在肿瘤的发生、发展中发挥作用。现对 *Beclin1*、自噬与肿瘤发生、发展关系的最新进展作一综述。

【关键词】 *Beclin1*; 自噬; 肿瘤

Autophagy-associated Gene *Beclin 1* and Tumor ZHAO Jian-hong¹, WAN Xiao-yun², XIE Xing². (¹Red cross Hospital, Hangzhou 310003; ²Woman's Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)
Corresponding author : WAN Xiao-yun. E-mail: wanxy@zju.edu.cn

【Abstract】 Autophagic cell death is a type of programmed cell death different from apoptosis, caspase-independent. Many studies have suggested that the change of autophagic activity, autophagic cell death are related to occurrence and development of malignancy. Some oncogenes and tumor suppressor genes are involved in the regulation of autophagic activity. *Beclin 1*, a autophagy execution genes, may participate in the occurrence and progress of tumor through regulating autophagic capacity. This review summarizes the present conditions of *Beclin 1*, autophagy and their correlation with the occurrence and development of tumor.

【Key words】 *Beclin 1*; Autophagy; Neoplasms

细胞生存的动态平衡依赖于细胞内大分子蛋白的生物合成和分解代谢的平衡。这个平衡的破坏是造成肿瘤细胞生长和适应营养环境的重要原因。目前认为细胞死亡分为 3 种类型,坏死(necrosis)、凋亡(apoptosis)以及自噬(autophagy)性细胞死亡。自噬性细胞死亡是一种不同于凋亡、不依赖于 caspase 的程序性细胞死亡,自噬是一个发生在真核细胞中由细胞初级溶酶体处理内源性底物的重要过程。生命体借此维持蛋白代谢平衡及细胞环境的稳定。这一过程在细胞清除废物、结构重建以及生长发育中起重要作用,并与疾病的发生密切相关。大量研究发现自噬活性的变化与恶性肿瘤的发生、发展有关。自噬活性的改变可能与某些基因调控异常有关,*Beclin 1* 蛋白是一种新的 Bcl-2 相互作用的细胞内蛋白,它参与自噬活性的调节,从而在肿瘤的发生、发展中发挥重要的作用。现将 *Beclin 1*、自噬与肿瘤发

生、发展的关系的最新研究进展作一综述。

1 自噬作用

自噬性细胞死亡是一种不同于凋亡的不依赖于 caspase 途径的程序性细胞死亡,去除营养、过氧化损害都可以诱导自噬发生。它的特点是在细胞内形成具有双层或多层胞膜包裹的含有细胞器及大量细胞质的吞噬泡,然后与自身的溶酶体结合,发生细胞器的降解和转化。主要分为 3 种类型:巨型自噬、微型自噬和分子伴侣介导的自噬。其中,巨型自噬主要负责降解细胞内稳定并永久存在的蛋白质,产生氨基酸以维持细胞在缺乏营养时的生存。自噬的一个显著特征是“自体吞噬泡”的形成。尽管对自噬具体过程的了解还需要大大加强,但是人们已经初步认识了自噬的大致过程,首先细胞质中的线粒体等细胞器被称为“隔离膜”的囊泡所包被,这种“隔离膜”主要来自于内质网和高尔基体^[1];囊泡最终形成双层膜结构,即自噬体,也称之为初始自体吞噬泡;自噬体与胞内体融合形成中间自体吞噬泡;最终自体吞噬泡的外膜与溶酶体融合形成降解自体吞噬泡,由溶酶体内的酶降解自体吞噬泡中的内容物和

通讯地址:310003 杭州,浙江省杭州市红十字会医院妇产科(赵剑虹);310003 杭州,浙江大学医学院附属妇产科医院(万小云、谢幸)

通讯作者:万小云 (E-mail: wanxy@zju.edu.cn)

内膜^[2]。在整个自体吞噬过程中,细胞质和细胞器都受到破坏,最明显的是线粒体和内质网受损。虽然自体吞噬并不直接破坏细胞膜和细胞核,但有证据表明,在最初断裂或消化后,细胞膜和细胞核会最终变成溶酶体以消化和分解自身。

自噬的生理作用目前认为有以下三方面:①与细胞发生、分化过程中的重塑有关;②营养不足时通过自我降解促进氨基酸的产生;③去除不需要的、损伤的细胞器和分子。在病理方面,自噬可能与多种肌病,神经元降解性疾病及多种肿瘤的发生、发展有关^[3]。迄今为止,自噬的诊断主要在电镜下进行形态学观察,但是许多与溶酶体活性有关的蛋白如 ubiquitin、cathepsin-D、Rab7、LC3 等也可以作为自噬活性诊断指标,尤其是 LC3,目前被认为是比较特异的自噬诊断指标。

在细胞程序性死亡中,自噬可能比凋亡扮演更为主动的角色。它在细胞程序性死亡的早期阶段起到保护性作用^[4],还可以通过自噬使自身与其他细胞隔离以防被毁灭,然而,在细胞程序性死亡后期,它则促进细胞死亡^[5]。近年的研究还认为自噬通过阻断凋亡途径而保持细胞内环境的稳定^[6],因此 I 型与 II 型细胞程序性死亡之间的关系尚需进一步研究。有大量研究发现自噬活性改变与肿瘤的发生有密切关系。抑制自噬可促进癌前期细胞的生长,自噬在该阶段起抑癌作用^[1,7]。随着肿瘤的生长,肿瘤细胞需要自噬适应营养缺乏和低氧环境,尤其是肿瘤内部缺少血管的区域^[5]。对原发性肝细胞癌的动物实验研究,发现自噬活性明显下降,从癌细胞中分离出的溶酶体也显示出明显的活性下降。在对胰腺癌的研究中也发现,胰腺癌形成的前期,自噬活性是增加的,而腺瘤向腺癌转化的过程中,自噬活性明显降低,提示在胰腺癌的发生过程中自噬活性降低可能是必须的或自噬活性降低与肿瘤的恶性程度是一致的^[7]。然而,自噬在肿瘤的发生、发展中的作用机制以及在肿瘤治疗方面能否发挥作用等仍然不清,这正是目前国际肿瘤学界研究的热点。

细胞增生或细胞程序性死亡受基因调控,基因调控异常与肿瘤发生密切相关。自噬活性的改变也与某些基因调控异常有关。研究发现某些癌基因、抑癌基因参与了自噬活性的调节,这些基因包括 *C-myc*、*Ras*、*PTEN*、*PI3K*、*Akt/PKB*、*DAPK* 和 *Beclin1* 等^[7]。其中对 *Beclin 1* 的研究最多。

2 *Beclin 1* 对自噬的调节作用

Beclin 1 是 Liang 等^[8]在研究 Bcl-2 保护中枢神

经系统抵御 Sindbis 病毒感染的机制时,在成年大鼠脑基因中筛选 2 种杂种酵母菌来识别 Bcl-2 相关基因产物时发现的一种新的基因。*Beclin 1* 位于人类染色体 17q21 上,是其 400 kb 区域的 12 个基因之一,大约有 150 kb,完整的 *Beclin 1* 的 cDNA 序列编码 1 个 2 098 bp 的转录产物,含有 1 个 120 bp 的 5' UTR,1 353 bp 的编码区域以及 625 bp 的 3' UTR。*Beclin 1* 有 12 个外显子,外显子 5 和 6 包含 Bcl-2 黏合物区域,外显子 6~8 包含卷曲状螺旋区域,与肌浆球蛋白有 25%~28% 同源^[9]。*Beclin 1* 编码 450 个氨基酸、60 kDa 卷曲螺旋状蛋白,该蛋白与细胞骨架相结合。采用 RNA 印迹分析显示 *Beclin 1* mRNA 在人和鼠的组织中广泛表达,尤其在骨骼肌中高表达。对人 *Beclin 1* 采用 PROSITE 分析识别出许多潜在的糖基化、磷酸化以及肉豆蔻酰位点。*Beclin 1* 通过调节自噬活性,从而在胚胎的发展和抑制肿瘤中起着重要作用。

研究发现有多种基因在营养缺乏时诱导自噬。自噬蛋白的转换(turnover)由 I 型和 III 型磷酸酰肌醇 3 激酶(PI3K)调节。I 型 PI3K 和其下游的信号转换成分 Akt 和 TOR 可以抑制自噬,而 *PTEN* 通过负调节 I 型 PI3K 的活性来诱导自噬。相反,III 型 PI3K 是自噬空泡形成和空泡传送到溶酶体所必需的。*Apg6* 是酵母中与自噬有关的基因,是一种 III 型 PI3K 相互作用的蛋白。人 *Beclin 1* 与 *Apg6* 有 24.4% 的氨基酸相同,是哺乳动物 *Apg6* 的同源基因。Liang 等^[10]建立了同基因野生型酵母(SEY620),*apg6/vps30* 被破坏的酵母(JCY3000),JCY3000 转染 *apg6/vps30* 酵母,JCY3000 转染 *Beclin 1* 酵母,及 JCY3000 转染空载体的酵母。他们比较了在氮缺乏条件下经 4 h 转染的上述酵母中自噬体的百分数,发现在野生型 SEY621 酵母,转染 *apg6/vps30* 和转染 *Beclin 1* 的 JCY3000 酵母中有大量的自噬体。相反,在没有转染的 JCY3000 和转染空载体的 JCY3000 酵母中极少有自噬体。这些结果显示 *Beclin 1* 可恢复 *apg6/vps30* 被破坏自噬缺陷的酵母的自噬活性和空泡蛋白的排列。因此证实 *Beclin 1* 是与自噬有关的基因,是与酵母 *Apg6/Vps30* 同一起源的人类基因。Kihara 等^[11]在哺乳动物细胞中还发现所有 *Beclin 1* 与 PI3K 形成联合体,而只有 50% PI3K 与 *Beclin 1* 结合,主要在跨越高尔基体网上(TGN),与自噬中膜动力学调节有关。Tassa 等^[12]在 C₂C₁₂ 肌管中发现氨基酸缺乏可通过调节 III 型 PI3K 与 *Beclin 1* 自噬复合体刺激蛋白质水解。

Scarlati 等^[13]研究发现神经酰胺通过干扰抑制 I 型 PI3K 信号途径和刺激 *Beclin 1* 基因的表达来调节自噬。Caspase 是与凋亡相关的一种需要胱氨酸、门冬氨酸盐的蛋白酶家族。Yu 等^[14]研究发现 caspase-8 不仅可调节凋亡,还可抑制自噬性细胞死亡。Caspase-8 抑制剂可通过调节 *Beclin 1* 和 *apg7* 来促进自噬。Yue 等^[15]在研究杂种鼠小脑皮质中层浦肯野细胞死亡时发现由 *GluRδ/nPIST/Beclin1* 联合体诱导激活的 *GluRδ^{Lc}* 受体可刺激自噬。*Beclin 1* 或 *Beclin 1* 和 *nPIST* 在 *GluRδ^{Lc}* 作用下从联合体的释放是杂种鼠小脑皮质中层浦肯野细胞自噬激活的至关重要的一步,*nPIST* 和 *Beclin 1* 共同促进自噬。综上所述,*Beclin 1* 主要通过 III 型 PI3K 形成复合体来调节其他的 Apg 蛋白定位到自噬前体结构中,从而调节自噬活性。

Beclin 1 还与 Bcl-2 家族有关,Liang 等^[8]证明 *Beclin 1* 通过与 Bcl-2 相互作用,在宿主中枢神经系统抗 Sindbis 病毒发病机制中起作用。其第 88 ~ 151 位氨基酸是与 Bcl-2 和 *Bcl_{XL}* 相互作用的部位。Shimizu 等^[16]研究发现 Bcl-2 和 *Bcl_{XL}* 的过度表达可促进非凋亡性细胞死亡,当 *Beclin 1* 处于静止状态时这种情况可被停止。由于 *Beclin 1* 与 Bcl-2/*Bcl_{XL}* 相结合,而且静止状态的 *Beclin 1* 减少 *APG5* ~ *APG12* 水平,所以 Bcl-2/*Bcl_{XL}* 可能通过调节 *Beclin 1* 影响自噬体的形成。最近的研究还发现 Bcl-2 不仅是一种抗凋亡蛋白,还通过其对抑制与 *Beclin 1* 相互作用起抗自噬蛋白的作用^[17],提示 Bcl-2 家族蛋白不仅调节凋亡,而且还通过自噬基因 *APG5* 和 *Beclin 1* 控制非凋亡的细胞程序性死亡——自噬性细胞死亡。

如上所述,*Beclin 1* 不是自噬所必需的,但其担当了一个更特别的角色,可能调节着自噬反应的数量或限制来自不同细胞器或不同细胞环境下蛋白的降解。例如,*Beclin 1* 可能与正性调节细胞生长和增殖中必需蛋白的转换有关。Cheng 等^[18]发现 *Beclin 1* 黏合蛋白 CAL(也称 PIST)的过度表达减少了细胞表面 CFTR 氯化物通道的表达,而糖蛋白 P 水平没受影响,提示 *Beclin 1* 在蛋白降解中起着特殊作用。因此,一种包含 *Beclin 1* 的蛋白复合体可调节与信号转换和/或营养获得相关的血浆膜蛋白的交换和周转。

3 *Beclin 1* 与肿瘤

最初人们在体外将 *Beclin 1* 稳定转染入 MCF7

乳腺癌细胞系中,结果发现 *Beclin 1* 导入后可使细胞的恶性表型下降,并通过促进自噬活性抑制细胞增殖。*Beclin 1* 在 MCF7 乳腺癌细胞系中的表达可增加自噬空泡的数量,并可在氨基酸缺乏时增加长命蛋白的降解。在对裸鼠的研究中也发现过度表达 *Beclin 1* 的 MCF7 可削弱其致癌能力。3-甲基腺嘌呤(3-MA)是一种核苷派生物,可在早期抑制自噬小体的形成,将 3-MA 加入 MCF7 细胞可抑制 *Beclin 1* 引起的自噬^[10]。野生型的 *Beclin 1* 定位在细胞质内的细胞器和核,其出核信号片段富含亮氨酸,用核输出信号抑制物 leptomycin B 或在 CRM1 核与质输出信号中突变缺失的 *Beclin 1*,结果 *Beclin 1* 几乎都存在与细胞核,可同时减少自噬活性和促进肿瘤,提示 leptomycin B 敏感的亮氨酸丰富的出核信号片段和 CRM1 核输出途径在 *Beclin 1* 调节自噬活性中起重要作用^[19]。

最近,有学者通过建立了携带有 *Beclin 1* 杂合缺失的鼠模型以进一步研究 *Beclin 1* 对自噬性细胞死亡以及凋亡的作用,结果发现 *Beclin 1^{+/-}* 杂合缺失的鼠的自发性肿瘤的发生率很高,这些自发肿瘤包括肺腺癌、肝细胞癌以及淋巴瘤等,在这些 *Beclin 1* 杂合缺失的鼠细胞中自噬活性明显下降,但没有证据证明凋亡的改变。并发现 *Beclin 1* 的缺失可导致自噬空泡形成减少,*Beclin 1* 介导的调节自噬活性对哺乳动物正常生长发育是必需的,哺乳动物中 *Beclin 1* 的缺失可明显增加上皮性和造血系统的恶性肿瘤的发生。在试管内培养的 *Beclin 1^{-/-}* 的胚胎细胞(ES)中也可发现自噬活性减少,然而,对 DNA 损伤的反应以及停止血浆供给后的凋亡反应都是正常的。这些发现提示 *Beclin 1* 与 I 型细胞死亡即凋亡的关系并不明显。总之,以上的研究表明自噬减少是形成肿瘤的原因之一,而且 *Beclin 1* 是单一缺失的抑癌基因^[20,21]。

在对人类肿瘤组织的研究也发现一些恶性肿瘤组织中存在 *Beclin 1* 基因的缺失性突变,据报道 75% 卵巢癌、50% 乳腺癌以及 40% 前列腺癌中存在 *Beclin 1* 基因的缺失性突变^[9]。有作者用免疫组化法分析显示 32 例乳腺癌中 18 例 *Beclin 1* 蛋白表达明显下降^[8,19],用免疫印迹法比较 *Beclin 1* 蛋白在乳腺癌组织与相应的正常乳腺组织中的表达,结果显示 17 例乳腺癌组织中有 15 例 *Beclin 1* 蛋白表达减少。在对 22 株乳腺癌细胞系的研究发现 41% 的细胞株存在 *Beclin 1* 等位基因的缺失,提示 *Beclin 1* 可作为抑癌基因^[22]。

研究还发现一些用于治疗肿瘤的药物可能是通过调节 *Beclin 1* 激活自噬而发挥作用的。例如,雌激素拮抗剂三苯氧胺 (Tamoxifen) 作用于乳腺癌细胞系 MCF-7 后,可以引起典型的自噬特征的细胞死亡,临床上 Tamoxifen 常用于治疗乳癌,该作用可能是通过一个神经酰胺介导的过程调节 *Beclin 1* 从而激活自噬作用来实现的^[13]。EB1089,一种维生素 D 类似的化疗药物,作用于 MCF-7 细胞通过与依赖 *Beclin 1* 的自噬相关的途径触发了细胞核的凋亡,从而导致染色体的浓集和 DNA 断裂而杀死肿瘤细胞^[23]。

综上所述,迄今的研究提示自噬活性的下降与恶性肿瘤的形成可能有因果关系,*Beclin 1* 首先从酵母中与 Bcl-2 相互作用的蛋白中分离出来,而 *Beclin 1*/Bcl-2 在抑癌中的相互作用,*Beclin 1* 的自噬诱导作用及其在 Bcl-2 致瘤活性中的作用还有待进一步研究。通过深入研究 *Beclin 1*、自噬以及与恶性肿瘤的关系,必将对探讨恶性肿瘤的发生、发展机制并最终开发出新的治疗手段奠定理论基础。

参 考 文 献

- 1 Ogier-Denis E, Codogno P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1603:113-128.
- 2 Nara A, Mizushima N, Yamamoto A, et al. SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation. *Cell Struct Funct*, 2002, 27:29-37.
- 3 Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, 306: 990-995.
- 4 Jellinger KA, Stadelmann C. Mechanisms of cell death in neurodegenerative disorders. *Neural Transm Suppl*, 2000, 59:95-114.
- 5 Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol*, 2004, 14: 70-77.
- 6 Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 1025-1040.
- 7 Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 2004, 23: 2891-2906.
- 8 Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol*, 1998, 72: 8586-8596.
- 9 Aita VM, Liang XH, Murty VV, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on

- chromosome 17q21. *Genomic*, 1999, 59: 59-65.
- 10 Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 1999, 402: 672-676.
- 11 Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, et al. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep*, 2001, 2: 330-335.
- 12 Tassa A, Roux MP, Attaix D, et al. Class III phosphoinositide 3-kinase-Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem J*, 2003, 376: 577-586.
- 13 Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, et al. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem*, 2004, 279: 18384-18391.
- 14 Yu L, Alva A, Su H, et al. Regulation of an ATG7-Beclin1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 2004, 304: 1500-1502.
- 15 Yue Z, Horton A, Bravin M, et al. A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron*, 2002, 35: 921-933.
- 16 Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 2004, 6: 1221-1228.
- 17 Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005, 122: 927-939.
- 18 Cheng J, Moyer BD, Milewski M, et al. A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J Biol Chem*, 2002, 277:3520-3529.
- 19 Liang XH, Yu J, Brown K, et al. Beclin1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res*, 2001, 61: 3443-3449.
- 20 Yue Z, Jin S, Yang C, et al. Beclin1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 15077-15082.
- 21 Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the Beclin1 autophagy gene. *J Clin Invest*, 2003, 112: 1809-1820.
- 22 Aita VM, Liang XH, Murty VV, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 1999, 59: 59-65.
- 23 Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Mathiasen IS, et al. Vitamin D analog EB1089 Triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. *Cell Death Differ*. 2005, 12: 1297-1309.

(收稿日期:2005-12-09)

(本文编辑:孙岩伟)