

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00946

· 论 著 ·

## A型主动脉夹层组织 Beclin1 及微管相关蛋白 1 轻链 3 的表达及意义

唐杨烽, 韩林, 徐激斌, 宋智钢, 陆方林, 邹良建, 徐志云\*

第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探讨自噬相关蛋白 Beclin1 及微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)在 A 型主动脉夹层组织中的表达及意义。  
**方法** 选取因 A 型主动脉夹层(AD)而于我院行手术治疗患者术中切除的主动脉壁组织标本 20 例作为 AD 组,以尸检者的正常胸主动脉(NA)壁组织标本 10 例作为对照。采用免疫组化染色及蛋白质印迹技术检测血管组织中 Beclin1 及 LC3 蛋白的定位及表达差异。  
**结果** A 型主动脉夹层主动脉壁组织中 Beclin1 及 LC3 蛋白主要定位表达于血管平滑肌细胞,且含量高于正常对照组织( $P < 0.05$ )。  
**结论** A 型主动脉夹层主动脉壁中血管平滑肌细胞的自噬活性明显增强,可能与疾病的发生发展相关。

**[关键词]** 自噬; 夹层动脉瘤; 主动脉; 血管平滑肌细胞; Beclin1; 微管相关蛋白 1 轻链 3

**[中图分类号]** R 543.16 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)09-0946-03

### Expressions of Beclin1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3) in type A aortic dissection tissues

TANG Yang-feng, HAN Lin, XU Ji-bin, SONG Zhi-gang, LU Fang-lin, ZOU Liang-jian, XU Zhi-yun\*

Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the expressions of Beclin1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3) in type A aortic dissection (AD) tissue and to discuss the relevance. **Methods** Twenty surgical AD specimens were used in this study, and 10 normal control specimens were obtained from autopsy. Immuno-histochemical staining and Western blotting analysis were performed to evaluate the locations and expressions of Beclin1 and LC3 proteins. **Results** It was found that Beclin1 and LC3 proteins were mainly located in the vascular smooth muscle cells of the AD tissues, and the expressions in the AD tissues were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Autophagy is activated in the vascular smooth muscle cells of AD tissues, which may play an important role in the development and progression of thoracic aortic dissection.

**[Key words]** autophagy; dissecting aneurysm; aorta; vascular smooth muscle cells; Beclin1; microtubule-associated protein 1 light chain 3

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(9):946-948]

主动脉夹层(aortic dissection, AD)是指血液经撕裂口流入胸主动脉壁中层形成夹层血肿并沿主动脉壁延伸剥离的致死性血管疾病<sup>[1]</sup>。按 Stanford 分型可分为 A 型及 B 型,其中 A 型主动脉夹层更为常见。临床资料显示,约 80% 的 A 型主动脉夹层未救治患者在 2 周内因夹层破裂导致死亡<sup>[2]</sup>。迄今,其确切的发病机制尚未明确。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的生物学性质改变可能是导致 AD 发生及发展的主要病理生理机制。

近年来,自噬(autophagy)被证明参与了机体众多的生理及病理过程,在调控细胞增殖、分化及凋亡等生物学活动中发挥了重要作用,但在 AD 血管组

织中 VSMC 生物学性质改变的作用并不明确。因此,本研究通过检测自噬相关蛋白在人 A 型主动脉夹层主动脉壁组织中的定位及表达情况,以明确自噬在 A 型主动脉夹层发病过程中的可能作用。

### 1 材料和方法

1.1 一般资料 20 例 AD 组织标本来自我院胸心外科 Stanford A 型主动脉夹层患者术中切除的升主动脉夹层病变血管,除外马凡综合征、大动脉炎等病史者,作为 AD 组;10 例对照标本取自尸检患者的升主动脉壁组织,无动脉夹层及动脉扩张病史,且年龄、性别与 AD 组相匹配,作为正常对照组(normal

[收稿日期] 2013-05-10 [接受日期] 2013-08-15

[作者简介] 唐杨烽,博士. E-mail: tangyfch265@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161752, E-mail: zhiyunx@hotmail.com

aortic artery, NA)。标本留取后立即置于液氮中保存,另一部分经4%甲醛固定、脱水、组织浸蜡、包埋,连续切片5  $\mu\text{m}$ 厚,用于免疫组化染色检查。

1.2 主要材料及试剂 兔抗人微管相关蛋白1轻链3(LC3)多克隆抗体及兔抗人 Beclin1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;过氧化酶标记的链霉卵白素试剂盒和 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组化染色检测主动脉壁 Beclin1 及 LC3 的定位表达 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶法。石蜡切片常规脱蜡水化,胰酶行抗原修复,依次滴加过氧化酶阻断液(37℃封闭10 min)、10%非免疫性动物血清(37℃孵育40 min)、一抗(1:100稀释,4℃过夜)、生物素标记的二抗(37℃孵育20 min)、S-A/HRP 溶液(37℃孵育20 min),DAB 显色后行苏木精复染,脱水透明,中性树胶封片。结果判断标准:切片均采用盲法由2位病理科医生独立阅片,细胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。

1.4 蛋白质印迹定量检测主动脉壁 Beclin1 及 LC3 的表达 以 Invitrogen 公司 SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Protein Standard 蛋白预染 Marker 作为对照,根据目的蛋白相对分子质量裁剪对应的膜区域进行蛋白质印迹检测。每个样本等量上样于12%聚丙烯酰胺凝胶中,进行电泳,半干电转至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉封闭2 h,分别加入兔抗人 LC3 多克隆抗体及兔抗人 Beclin1 多克隆抗体(1:1 000 稀释)和  $\beta$ -actin 鼠抗单克隆抗体(1:4 000 稀释),4℃孵育过夜,再加入相应二抗室温孵育1 h,ECL 化学发光法显色。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 免疫组化染色结果 免疫组化染色(图1)显示:致密的棕黄色颗粒即为 Beclin1 及 LC3 表达阳性的细胞,阳性表达主要定位于血管中膜的平滑肌细胞中,且主动脉夹层组织中 Beclin1 及 LC3 的阳性表达及染色强度高于正常对照组。

2.2 蛋白质印迹检测 Beclin1、LC3 蛋白表达 结果(表1、图2)表明:Beclin1 及 LC3 在主动脉夹层血管组织中的表达量高于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

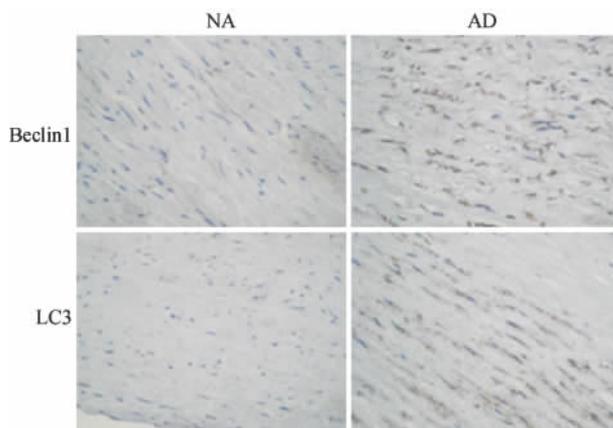


图1 免疫组化染色检测 NA 及 AD 组血管组织中 Beclin1、LC3 蛋白表达

Fig 1 Immunohistochemical staining of Beclin1 and LC3 protein in AD and NA group

NA: Normal aortic artery; AD: Aortic dissection. Original magnification:  $\times 200$

表1 NA 组与 AD 组 Beclin1、LC3 蛋白表达的比较

Items	AD (n=20)	NA (n=10)	P
$\bar{x} \pm s$			
Gray value			
$\beta$ -actin	2 523.1 $\pm$ 66.71	2 398.5 $\pm$ 59.45	
Beclin1	1 059.7 $\pm$ 33.52	359.8 $\pm$ 11.27	<0.05
LC3	580.3 $\pm$ 19.17	215.9 $\pm$ 12.83	<0.05
Relative expression/ $\beta$ -actin			
Beclin1	0.42 $\pm$ 0.09	0.15 $\pm$ 0.03	<0.05
LC3	0.23 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.02	<0.05

NA: Normal aortic artery; AD: Aortic dissection

## 3 讨论

自噬是细胞通过单层或双层膜包裹待降解物形成自噬体,然后运送到溶酶体形成自噬溶酶体并进行多种酶消化及降解的过程。自噬相关基因(auto-phagy related gene, Atg)是细胞自噬发生过程中的特异性基因,其编码的蛋白在自噬发生的各个阶段发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。早期研究认为,自噬将细胞内受损、变性或衰老的蛋白质以及细胞器运输到溶酶体内进行消化降解,是细胞适应营养或生长因子缺乏、低氧、内质网应激等有害刺激所产生的一种应激反应,在维持蛋白代谢平衡及细胞内环境稳定中具有重要意义<sup>[5]</sup>。但是随着对自噬研究的深入,发现自噬不仅是机体细胞各种损伤或应激后的代偿性修复反应,还作为损伤因素参与了多种疾病的发生过程。

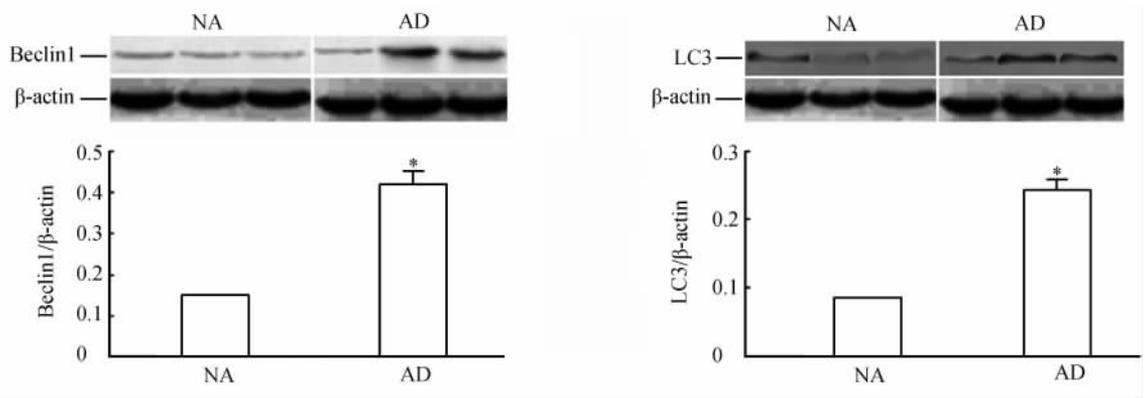


图2 正常主动脉及AD组织 Beclin1、LC3 蛋白蛋白质印迹检测结果

Fig 2 Western blotting analysis of Beclin1 and LC3 protein expressions in AD (n=20) and NA (n=10) artery groups

NA: Normal aortic artery; AD: Aortic dissection. \* P<0.05 vs NA group;  $\bar{x} \pm s$

Beclin1 是酵母自噬相关基因 Atg6 在哺乳动物中的同源基因,该基因定位于人染色体 17q21,其编码的 Beclin1 蛋白是自噬过程中的必需分子,它能介导其他自噬蛋白定位于吞噬泡,从而调控哺乳动物自噬体的形成与成熟<sup>[6]</sup>。LC3 是酵母自噬相关基因 Atg8 在哺乳动物中的同源基因,它能以 Atg5 依赖方式靶向定位于自噬体膜上,并在 Atg12-Atg5 解离后仍保留在膜上,是目前公认的自噬体标记物,通过对 LC3 的检测可以明确判断自噬活性的程度<sup>[3]</sup>。

本研究发现 AD 组血管组织中 Beclin1 及 LC3 的表达量高于 NA 组,提示 AD 血管组织中存在自噬活性增强现象,且通过免疫组化染色发现,相关蛋白主要定位表达于血管平滑肌细胞的细胞质中。结合既往自噬对细胞生物学活性调控作用的研究, Ying 等<sup>[7]</sup>在研究母系表达基因 3 下调诱发膀胱癌细胞增殖的过程中发现,自噬在其中发挥重要作用,自噬的激活促进了膀胱癌细胞增殖的发生。此外, Jin 等<sup>[8]</sup>研究发现自噬通过促进肺动脉血管平滑肌细胞增殖而参与肺动脉高压的病理形成过程; Zhang 等<sup>[9]</sup>及 Simon<sup>[10]</sup>的研究均发现自噬在调控心肌细胞的分化、发育等过程中具有重要作用。由此可以推测,自噬活性增强可能通过调控血管平滑肌细胞的生物学性质而参与 AD 的发生发展,但具体作用机制有待进一步研究。

综上所述, Beclin1 作为自噬通路上的关键调节蛋白,对研究该通路在 AD 发生发展中的意义具有重要价值。本研究表明自噬可能参与了 AD 的发生发展,但具体作用机制仍有待进一步研究阐明。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Golledge J, Eagle K A. Acute aortic dissection[J]. Lancet, 2008, 372: 55-66.
- [2] Criado F J. Aortic dissection: a 250-year perspective [J]. Tex Heart Inst J, 2011, 38: 694-700.
- [3] Behrends C, Sowa M E, Gygi S P, Harper J W. Network organization of the human autophagy system[J]. Nature, 2010, 466: 68-76.
- [4] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. Cell, 2008, 132: 27-42.
- [5] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, Klionsky D J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. Nature, 2008, 451: 1069-1075.
- [6] Liang X H, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1[J]. Nature, 1999, 402: 672-676.
- [7] Ying L, Huang Y, Chen H, Wang Y, Xia L, Chen Y, et al. Downregulated MEG3 activates autophagy and increases cell proliferation in bladder cancer[J]. Mol Biosyst, 2013, 9: 407-411.
- [8] Jin Y, Choi A M. Cross talk between autophagy and apoptosis in pulmonary hypertension [J]. Pulm Circ, 2012, 2: 407-414.
- [9] Zhang J, Liu J, Liu L, McKeehan W L, Wang F. The fibroblast growth factor signaling axis controls cardiac stem cell differentiation through regulating autophagy [J]. Autophagy, 2012, 8: 690-691.
- [10] Simon H U. Autophagy in myocardial differentiation and cardiac development[J]. Cir Res, 2012, 110: 524-525.