

过表达Beclin 1对食管癌Eca109细胞株 裸鼠成瘤的影响

陈江勇¹ 吴庆琛^{1*} 张 诚¹ 李 强¹ 洪 斌² 陈 丹¹ 张 敏¹

(¹重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016; ²重庆医科大学附属永川医院胸心外科, 重庆 402160)

摘要 自噬是一个进化上保守的溶酶体降解途径, 激活自噬可以降解有缺陷的细胞器而发挥抑制肿瘤的作用, *Beclin 1* 是关键的自噬和肿瘤抑制基因。该研究检测了 *Beclin 1* 蛋白在食管癌组织中的表达情况, 构建 *Beclin 1* 的重组质粒并转染入食管癌 Eca109 细胞株。分别以电子显微镜观察自噬体的形成和 Eca109 细胞的自噬性死亡情况, RT-PCR 检测 *Beclin 1* 基因的 mRNA 表达, Western blot 法检测 *Beclin 1* 及 Bcl-2、P53 的表达水平, 裸鼠成瘤实验检测 *Beclin 1* 基因对 Eca109 细胞体内增殖的影响。结果显示, *Beclin 1* 蛋白在食管癌组织中相对于癌旁正常食管组织低表达 ($P < 0.05$); 成功构建了 *Beclin 1* 重组质粒并将其转染到 Eca109 细胞中, 电子显微镜观察到自噬体形成, RT-PCR 和 Western blot 显示 *Beclin 1* 基因过表达。升高 *Beclin 1* 蛋白的表达水平能降低 Bcl-2 表达和上调 P53 蛋白, 使 Eca109 细胞的体内致瘤性减弱。过表达 *Beclin 1* 基因对食管癌有很好的抑制作用, 这将为食管癌的靶向治疗奠定基础。

关键词 食管癌; *Beclin 1*; Eca109 细胞株; 过表达; 裸鼠

The Effect of Overexpressed Beclin 1 on Esophageal Cancer (Eca109) Cells *in vivo*

Chen Jiangyong¹, Wu Qingchen^{1*}, Zhang Cheng¹, Li Qiang¹, Hong Bin², Chen Dan¹, Zhang Min¹

(¹Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Department of Cardiothoracic Surgery, Yongchuan Hospital Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract Autophagy is an evolutionarily conserved lysosomal degradation pathway, and activation of autophagy may function as a tumor suppressor by degrading defective organelles and other cellular components. *Beclin 1* is a main actor of autophagy, also known as a tumor suppressor gene. In the present study, we examined the expression of *Beclin 1* in esophageal cancer by immunohistochemical SP method, *Beclin1* recombinant plasmid pIRES2-ZsGreen1-hBeclin 1 was constructed and transfected into Eca109 cells. Autophagy was observed under electron microscopy. The expression of *Beclin 1* at mRNA level was detected by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and Western blot was used to examine the protein expression of *Beclin 1*, Bcl-2 and P53. Moreover, *in vivo*, the proliferation of the cancer cells was evaluated in xenotransplant nude mice model. The results showed that reduced *Beclin 1* expression was observed in esophageal cancer cells than in normal

收稿日期: 2012-11-05 接受日期: 2012-12-21

重庆市卫生局重点课题(批准号: 20121015)资助的课题

*通讯作者: Tel: 023-89011132, E-mail: wuqc6@hotmail.com

Received: November 5, 2012 Accepted: December 21, 2012

This work was supported by the Key Program of the Health Bureau of Chongqing (Grant No.20121015)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011132, E-mail: wuqc6@hotmail.com

网络出版时间: 2013-03-05 14:58 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130305.1458.002.html

tissues($P<0.05$). We successfully constructed *Beclin 1* recombinant plasmid and transfected it into Eca109 cells, autophagosomes were widely formed. The results of RT-PCR and Western blot showed that the expression of *Beclin 1* was remarkably higher in transfected group ECA109 cells at both mRNA and protein levels than that of control group and untransfected group. In addition, the protein expression of Bcl-2 was down-regulated but P53 up-regulated after transfected. *In vivo*, the average weight and volume of tumor in *Beclin 1* transfection group xenografts mice were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The result suggested that *Beclin 1* gene can well inhibit esophageal cancer, and this lay the foundation for targeted therapy for esophageal cancer.

Key words esophageal cancer; Beclin 1; Eca109 cell line; overexpression; nude mice

食管癌是最常见的消化道肿瘤之一, WHO将其列为世界第七位常见肿瘤, 在全球癌症死亡的最常见的原因中排第六位。食管癌预后较差, 5年生存率美国约为10%、欧洲16%^[1]。我国是世界上食管癌的高发区, 其发病率和死亡率均居世界之首, 食管癌死亡占全国恶性肿瘤死亡的22%, 仅次于胃癌, 居第二位^[2]。食管癌的病因和发病机制目前仍不清楚, 是涉及多个基因的累积作用的结果。确定有效的诊断、治疗和预后的标志基因是目前急需解决的关键问题。

自噬是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程, 是真核细胞特有的生命现象。自噬与细胞的生长、增殖, 以至肿瘤的发生过程关系密切, 自噬的调控失调可以引起多种疾病, 如神经变性疾病、自身免疫病、恶性肿瘤等^[3-4]。在某些刺激条件情况下, 自噬可在细胞无法维持自身生存时诱导细胞主动性死亡, 有别于凋亡而被称为II型程序性死亡^[5]。近年来, 自噬与肿瘤的关系成为肿瘤领域的研究热点, *Beclin 1*与酵母菌ATG6同源, 是哺乳动物特有的自噬基因和自噬体形成的调控基因。人类许多肿瘤中(如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等)都发现*Beclin 1*基因的表达下调或缺失, *Beclin 1*作为一个抑癌基因而备受关注^[6]。本实验通过免疫组化检测*Beclin 1*在食管癌中的表达, 拟构建*Beclin 1*过表达载体转染Eca109细胞, 对比研究转染前后目的基因组和空载体组体内增殖的差异, 为*Beclin 1*基因靶向治疗食管癌奠定体内实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

食管癌Eca109细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院。1640细胞培养基、优质胎牛血清购自美国Hyclone公司, 脂质体2000、PBS、胰蛋白酶

购自美国Invitrogen公司, 人源*Beclin 1*(GenBank序列NM_003766)质粒pIRES2-ZsGreen1(Clontech)购自深圳百恩微生物有限公司(载体结构图见图1)。免疫组化试剂盒购自博士德生物科技公司, 兔抗*Beclin 1*、Bcl-2、P53多克隆抗体购自武汉三鹰公司, 兔抗 β -actin、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(二抗)、蛋白提取试剂盒、PMSF、BCA蛋白定量试剂盒、凝胶配制试剂盒、ECL显影剂均购自碧云天生物技术有限公司。RNA提取试剂Trizol、逆转录试剂盒以及扩增试剂盒均购自日本TaKaRa公司, 裸鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司(实验动物生产许可证: SCXK(京)2005-0013)。实验所需器材由重庆市神经病学重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化方法检测食管癌组织中*Beclin 1*蛋白的表达情况 选2011年10月-2012年4月在重庆医科大学附属第一医院就诊并接受食管癌根治术的食管癌患者, 取食管癌组织(经病理学诊断证实为食管鳞状细胞癌) 42例和癌旁正常食管组织(距离癌组织3~5 cm) 20例, 分别由病理检查确认, 液氮冻存。经10%多聚甲醛固定, 梯度酒精和二甲苯酚脱水, 石蜡包埋连续切片后, 采用SP法免疫组化法进行*Beclin 1*表达水平的检测。

1.2.2 自噬基因*Beclin 1*真核重组质粒的构建及其转染食管癌Eca109细胞株 应用RT-PCR方法扩增出编码*Beclin 1*的cDNA, 然后分别将载体质粒pIRES2-ZsGreen1及目的基因用*BamH I*和*EcoR I*双酶切, 分别回收质粒pIRES2-ZsGreen1酶切大片段和目的基因*Beclin 1*酶切产物, 质粒pIRES2-ZsGreen1回收大片段与目的基因连接, 连接产物转化后小量抽提质粒, 并分别用*EcoR I*+*BamH I*做酶切鉴定(酶切鉴定图谱如图2所示)。阳性克隆可酶切出1 353 bp的片段, 对鉴定正确的重组克隆进行测序验证, 测序正确后,

大量提取质粒并转染Eca109细胞。转染过程如下: 复苏食管癌Eca109细胞株、在37 °C、5% CO₂孵箱中培养并传至第三代, 转染前一天用胰酶消化、吹打重悬后计数, 每个6孔板接种4×10⁵个细胞。转染当天待细胞长至融合度约90%时, 开始转染。转染时先将接种好的6孔板培养基去除后, PBS清洗2次, 更换无血清1640培养基2 mL。然后, 配制A液=244 μL无血清培养基+6 μL Lipofectamine 2000(总体积250 μL/孔), 配制完后, 室温放置5 min使其融合均匀; B液=(246 μL无血清培养基+4 μL质粒)/每孔(实验组为重组质粒, 对照组为空载体质粒, 浓度均为1 μg/μL, B液总体积也为250 μL)。将A液和B液混合, 室温下放置20 min使其混合均匀后, 将A、B混合液逐滴加入6孔板, 轻轻摇动培养板混匀。在37 °C、5% CO₂中培养5 h, 更换含有血清的全培养基, 24 h之后, 以1:10的比例将细胞稀释到新的6孔板中, 加入含600 ng/mL G418的全培养基筛选有质粒基因表达的细胞株, 经15 d筛选获

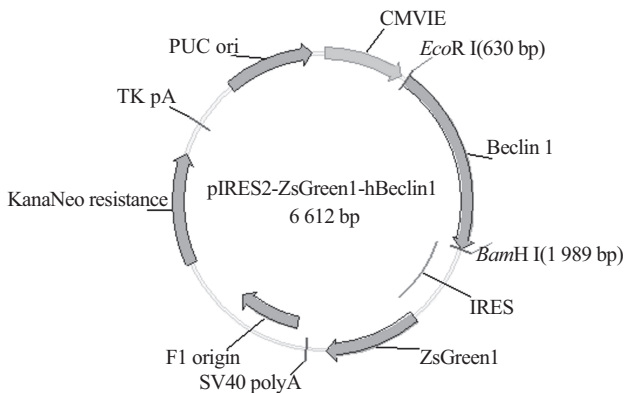


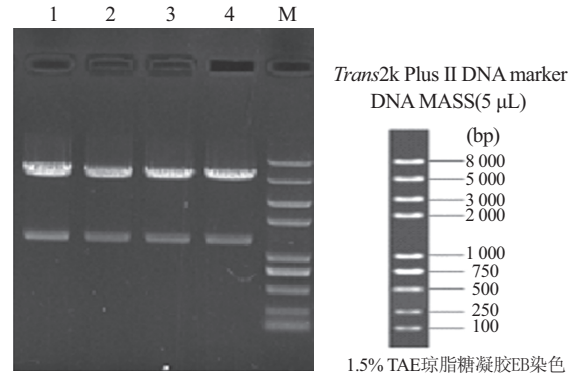
图1 pIRES2-ZsGreen1-hBeclin1质粒结构图

Fig.1 Structure of pIRES2-ZsGreen1-hBeclin1 plasmid

得相对稳定表达的细胞株后, 进行后续实验。

1.2.3 透射电镜观察转染Beclin 1基因的Eca109细胞株中自噬体的形成和自噬性细胞死亡 取转染后经G418筛选相对稳定表达的细胞株, 刮取收集5×10⁶细胞。5%戊二醛固定后, 切片固定, 分别在12 500倍、17 500倍、30 000倍、65 000倍透射电镜下观察自噬体形成和细胞自噬性死亡情况。电子显微镜照片在第三军医大学中心实验室拍摄。

1.2.4 RT-PCR检测转染前后Eca109细胞株中Beclin 1基因的表达情况 Beclin 1及β-actin引物由深圳百恩威生物科技有限公司设计, 以β-actin为内参。Beclin 1引物为: 上游: 5'-TAT TGA AAC TCC TCG CCA GGA-3'; 下游: 5'-GGC ATA ACG CAT CTG



M: marker; 1-4: EcoRI和BamHI双酶切质粒。

Lane M: marker; Lane1-4: pIRES2-ZsGreen-hBeclin 1 digested by EcoRI and BamHI.

图2 pIRES2-ZsGreen-hBeclin1双酶切鉴定

Fig.2 The electrophoresis of pIRES2-ZsGreen-hBeclin1 after restriction endonuclease digestion

GTT TT-3'。扩增片段为565 bp; β-actin引物为: 上游: 5'-TTT GAG ACC TTC AAC ACC CCA-3'; 下游: 5'-AAG GCT GGA AGA GTG CCT CA-3'。扩增片段为424 bp; 分别提取未转染组、空载体组及转染Beclin 1组Eca109细胞总RNA, 反转录为cDNA, 取反转录产物2 μL为模板, 分别扩增基因片段, Beclin 1、β-actin PCR扩增条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s、57 °C退火30 s、72 °C延伸1 min, 35个循环; 最后72 °C延伸5 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 实验重复三次。

1.2.5 Western blot检测转染前后各组细胞的Beclin 1、Bcl-2、P53蛋白表达情况 使用浆蛋白提取试剂盒, 收集经G418筛选稳定表达的细胞, 严格按照提取试剂说明书操作, 6孔板每孔加入60 μL蛋白提取试剂和0.6 μL PMSF混合液。蛋白提取完成后, 用BCA法测定蛋白浓度, 配平各组蛋白浓度。取总蛋白40 μg进行定量分析, 行10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至NC膜, 5%脱脂奶粉37 °C封闭1 h, 4 °C一抗孵育过夜, 复温1 h后TBST室温摇床洗膜3×15 min。再加入相应二抗37 °C温育1 h, TBST室温摇床洗膜3×15 min, 加ECL显色液后凝胶成像系统显色, 以β-actin为内参照, 计算各蛋白条带的相对表达量, 统计分析。

1.2.6 裸鼠成瘤实验 经MTT检测未转染组和空载体组细胞增殖差异无统计学意义后, 取经G418筛选后相对稳定表达的Beclin 1转染组和空载体组Eca109细胞, 按每只裸鼠1×10⁷的注射剂量接种于裸

鼠后腿部皮下, 2 d后接种部位见一白色小皮丘, 一周后逐渐转为实性结节并增大, 成瘤率达100%。监测肿瘤的生长情况, 每周游标卡尺测量肿瘤的长径和宽径一次, 按照体积计算公式计算瘤体积, 一个月时统一处死裸鼠, 完整剥离皮下瘤, 天平称重并拍照。裸鼠品系BALB/cA-nu, 委托第三军医大学第一附属医院动物实验室SPF级饲养(实验动物使用许可证: SYXK(渝)2012-0012)。

1.3 统计学分析

采用SPSS19.0统计软件, RT-PCR、Western blot的结果均采用 t 检验; 免疫组化结果采用单因素方差分析; 裸鼠瘤体体积采用重复测量方差分析。

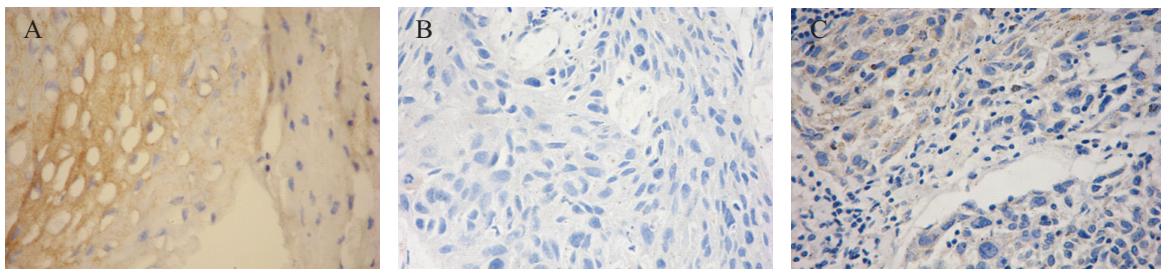
2 结果

2.1 免疫组化结果

免疫组织化学结果显示, Beclin 1蛋白在食管癌组织中低表达, 在癌旁正常食管组织中广泛表达。36例食管癌患者中Beclin 1阳性者32例(76.2%), 阴性10例(23.8%), 20例癌旁正常组织Beclin 1均表达阳性。相对于癌旁正常食管组织食管癌组织中Beclin 1的表达显著降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$)(图3)。

2.2 细胞转染结果

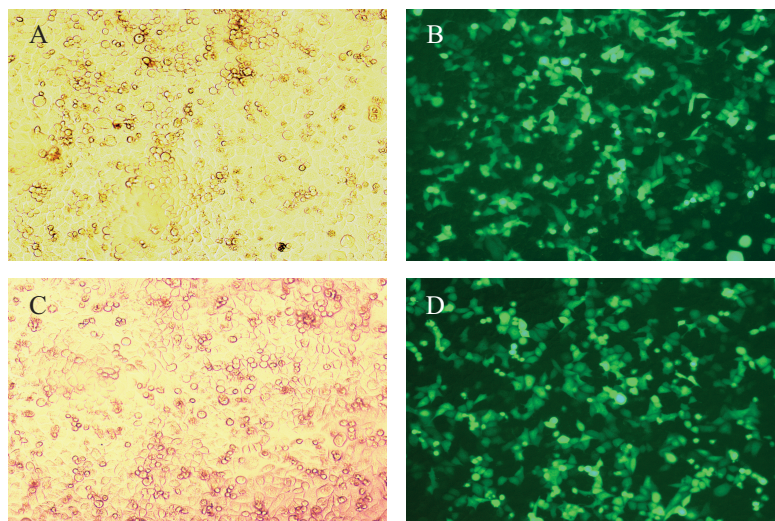
细胞转染pIRES2-zsGreen1-hBeclin1质粒72 h后, 置于荧光显微镜下观察, 转染组荧光强度约40%,



A: Beclin 1在癌旁正常食管鳞状上皮细胞胞浆中表达阳性; B: Beclin 1在食管癌组织中表达阴性; C: Beclin 1在食管鳞癌细胞胞浆中阳性低表达。
A: positive Beclin 1 immunoreactivity in cytoplasm of normal squamous epithelial cells; B: negative Beclin 1 immunoreactivity in tumor cells; C: positive Beclin 1 immunoreactivity in cytoplasm of tumor cells.

图3 免疫组化检测Beclin 1在食管癌和癌旁正常组织中的表达情况(400×)

Fig.3 Immunohistochemical analysis of Beclin 1 in esophageal squamous cell carcinoma(400×)

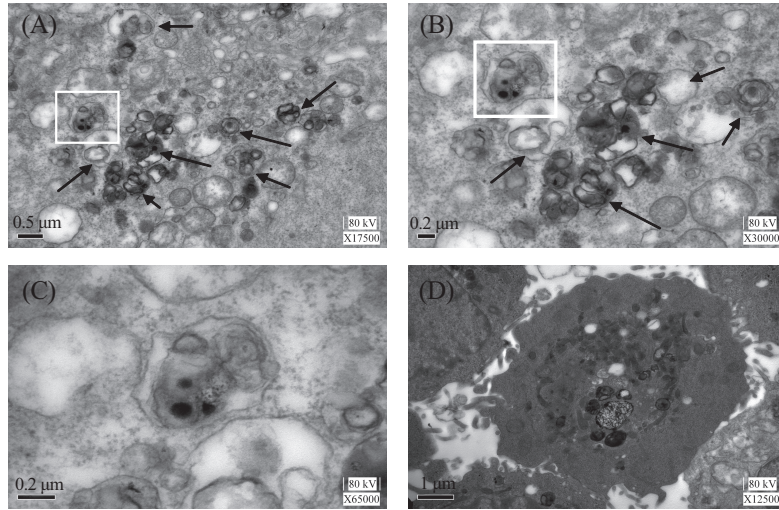


A: 光镜下的空载体组; B: 荧光显微镜下的空载体组; C: 光镜下的目的基因组; D: 荧光显微镜下的目的基因组。

A: the empty vector transfected group under optical microscope; B: the empty vector transfected group under fluorescence microscope; C: *Beclin 1* transfected group under optical microscope; D: *Beclin 1* transfected group under fluorescence microscope.

图4 Eca109细胞质粒转染结果(200×)

Fig.4 Plasmid transfection into Eca109 cells(200×)

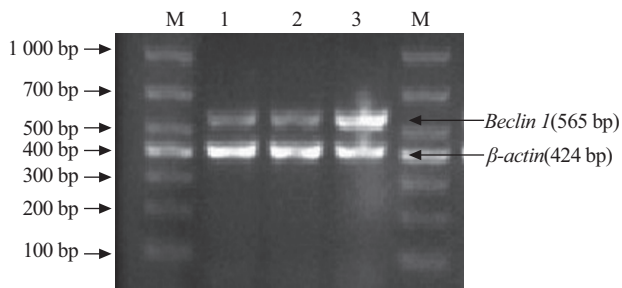


A,B: 自噬体在细胞内广泛形成(箭头所示); C: 典型自噬体结构: 包含细胞质和细胞器的双膜囊泡; D: 过度的自噬导致细胞死亡。

A,B: autophagosomes are widely intracellular formed (arrow shows); C: typical autophagosome structure characterized by a double membrane that contains cytoplasmic organelles magnified from □; D: excessive autophagy leading to cell death.

图5 透射电子显微镜观察Beclin 1过表达后Eca109细胞中自噬体形成

Fig.5 Overexpress Beclin 1 leads to autophagy in Eca109 cells under electron microscopy



M: marker; 1: 未转染组; 2: 转染空载体组; 3: 转染目的基因组。

M: marker; 1: untransfected group; 2: empty vector transfected group; 3: *Beclin 1* transfected group.

图6 *Beclin 1*在三组细胞中的转录水平

Fig.6 *Beclin 1* transcriptional levels in the three group cells

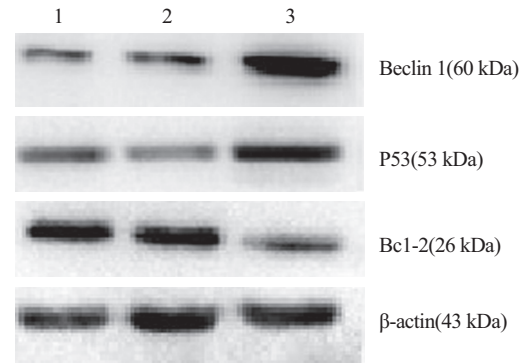
空载体组较目的基因组转染效率高, 转染效率约55%。经G418筛选2周后, 各组转染效率均能达到85%左右, 荧光强度和转染效率能达到预期的效果, 为后期实验奠定了基础(图4)。

2.3 透射电镜结果

在经G418筛选的转染*Beclin 1*组Eca109细胞中, 经透射电镜可观察到细胞内自噬体广泛形成, 出现典型的双层膜或多层膜囊泡结构, 囊泡内部可见到被包裹的细胞器, 并出现自噬性死亡(图5)。

2.4 RT-PCR检测转染前后*Beclin 1* mRNA表达结果

未转染组和空载体组细胞内*Beclin 1* mRNA表达量无统计学差异($P>0.05$), 目的基因组*Beclin 1* mRNA表达量明显高于未转染组和空载体组($P<0.05$), 结果



1: 未转染组; 2: 转染空载体组; 3: 转染目的基因组。

1: untransfected group; 2: empty vector transfected group; 3: *Beclin 1* transfected group.

图7 *Beclin 1*、P53、Bcl-2蛋白在三组细胞中的表达情况

Fig.7 *Beclin 1*, P53, Bcl-2 expressions in the three group cells

有统计学意义(图6和表1)。

2.5 Western blot检测各组细胞基因表达结果

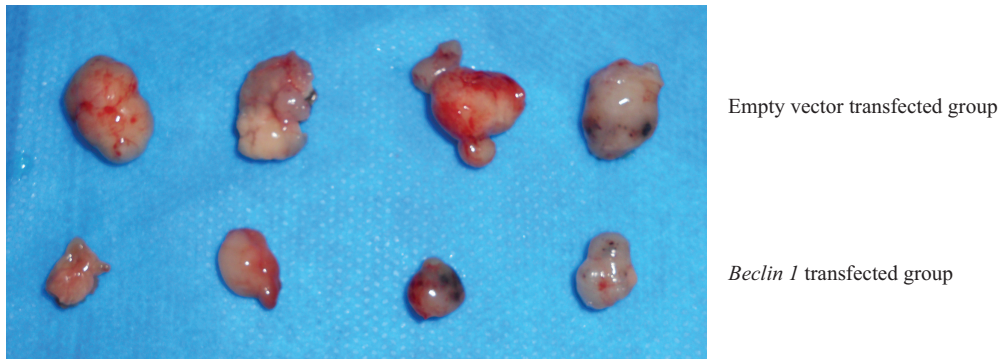
未转染组和空载体组细胞*Beclin 1*、Bcl-2、P53蛋白表达无明显差异($P>0.05$), 目的基因组*Beclin 1*和P53蛋白表达量明显高于未转染组和空载体组($P<0.05$), 而Bcl-2低于未转染组和空载体组($P<0.05$), 差异有统计学意义(图7和表1)。

2.6 裸鼠成瘤实验结果

皮下接种细胞2 d后接种部位见一白色小皮丘, 并逐渐缩小, 1周后逐渐转为实性结节并增大, 2周左右瘤体直径约7 mm, 成瘤率达100%。第2周末, 转染组皮下瘤生长速度明显慢于空载体组, 瘤体较空

表1 转染前后三组细胞间的mRNA和蛋白质水平比较($\bar{x}\pm s$)Table 1 The expression at mRNA and protein levels in the three group cells($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	Beclin 1转染组 Beclin 1 transfected group	空载体组 Empty vector transfected group	未转染组 Untransfected group
Beclin 1 mRNA	2.010 9±0.158 3	0.507 5±0.009 5	0.510 5±0.021 2
Beclin 1 protein	2.306 8±0.053 0	0.414 0±0.008 8	0.387 0±0.013 3
Bcl-2 protein	0.664 6±0.014 3	1.142 7±0.004 8	1.158 4±0.020 0
P53 protein	1.562 3±0.015 8	0.755 9±0.016 7	0.758 0±0.023 7



目的基因组瘤体明显小于空载体组。

The average weight and volume of tumor in *Beclin 1* transfection group were significantly lower than those in the control group.

图8 裸鼠成瘤实验结果

Fig.8 The result of nude mouse tumorigenicity assay

表2 *Beclin 1*组和空载体组裸鼠皮下瘤平均体积大小及重量($\bar{x}\pm s, n=4$)Table 2 The average volume and weight of tumor in *Beclin 1* transfected group and empty vector transfected group($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别 Group	体积(cm^3) Volume(cm^3)				重量(g) Weight(g)
	First week	Second week	Third week	Fourth week	
<i>Beclin 1</i> transfected group	0.019 6±0.004 6	0.045 6±0.006 7	0.202 8±0.028 5	0.361 7±0.106 7	0.558±0.099
Empty vector transfected group	0.028 8±0.003 5	0.081 0±0.009 8	0.507 4±0.114 3	1.295 2±0.070 0	1.586±0.045

载体组越来越小。实验组瘤体明显小于空载体组($P<0.05$)(体积= $1/2\times\text{长径}\times\text{宽径}^2$),重量也较空载体组轻($P<0.05$)(图8和表2),差异具有统计学意义。证明*Beclin 1*基因抑制了Eca109细胞的体内增殖,对食管癌成瘤有抑制作用。

3 讨论

我国是世界上食管癌的高发区,其发病率和死亡率均居世界之首,寻找敏感特异的早期诊断和预后判断指标以及有效的基因治疗方法是根治食管癌和获得长期生存的有效方法。自噬是一个细胞内容物被双层膜囊泡隔离包裹形成自噬体,并随后被传递到溶酶体降解的代谢过程。过高的自噬水平会因为关键细胞成分的降解而导致细胞自噬性死亡^[7-8]。自

噬的发生是一个多基因参与调控的复杂过程,其中*Beclin 1*是定位于自噬前体的关键因子,参与哺乳动物自噬体形成的调控,是哺乳动物参与自噬的特异性基因,在调节细胞凋亡和分化中起着关键作用,已被确定为一个新的抑癌基因。人类许多肿瘤中均存在*Beclin 1*表达的下调和缺失,研究报道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^[6]。*Beclin 1*杂合子敲除的小鼠更容易出现自发性肿瘤,包括淋巴瘤、肺癌、肝癌和乳腺癌前病变等^[9]。关于*Beclin 1*在食管癌中的作用,目前国内国外相关报道较少。

本实验以自噬基因*Beclin 1*为出发点,分别研究了食管癌组织和细胞*Beclin 1*蛋白的表达情况。研究证实了*Beclin 1*蛋白在食管癌组织中的低表达,同

时在癌旁正常食管组织中广泛表达, 这提示Beclin 1可能是食管癌抑癌蛋白, 为食管癌的早期诊断提供了一个有价值的方向, 这与Chen等^[10]的研究报告一致, 与Beclin 1在其他类型的肿瘤如卵巢癌、乳腺癌和肺癌中的表达情况基本类似^[6,11-12]。

诱导癌细胞死亡, 抑制其生长一直以来都是癌症治疗的主要研究方向。本研究成功构建并鉴定了pIRES2-ZsGreen-hBeclin1质粒并转染至Eca109细胞中, 实验过程中针对Eca109细胞的具体情况用了较文献报道低的脂质体剂量, 优化了转染的条件, 减少了因脂质体毒性引起的细胞死亡, 使细胞转染效率得到明显提高。透射电镜下超微结构的形态学检测是自噬体形成检测的金标准^[13], 在本次实验的质粒转染后, 我们运用电子显微镜观察了经转染细胞的自噬体广泛存在, 并运用PCR、Western blot验证了Beclin 1基因的高表达, 证实了过表达Beclin 1能确切地引起Eca109细胞自噬效应。后期本研究通过裸鼠成瘤实验验证了Beclin 1具有抑制食管癌Eca109细胞体内增殖的作用, 可以从以下方面解释: 一方面, 自噬基因作为一个管家基因在细胞中表达, 其功能是清理受损细胞器和在细胞遭遇外界有害刺激时给细胞提供能量。在自噬缺陷的肿瘤细胞中, 由于不能够很好地形成自噬体, 导致肿瘤细胞不能够提供足够的能量去复制和修复DNA与检查和修复蛋白质的损伤。由于不能够有效地去除受损的线粒体导致活性氧产生过多。以上原因引起染色体的不稳定, 从而促进肿瘤的发生^[14-15]。另一方面, Beclin 1不足导致的自噬的下调会引起癌细胞微环境的改变, 促使慢性炎症因子和细胞因子的释放, 从而刺激肿瘤的生长。过表达Beclin 1基因一方面能导致自噬性死亡, 另外, Beclin 1上有一个BH3的结构域和抗凋亡蛋白Bcl-2结合使其表达降低, 从而引发Eca109细胞凋亡^[16]。同时, 自噬体形成可以清理受损细胞器给DNA和蛋白质的修复提供能量, 使肿瘤组织的内环境相对稳定, 使促进肿瘤生长的炎症因子和细胞因子释放减少^[15]。此外, 抑癌基因P53的表达上调发挥了肿瘤抑制的作用也是一个重要的原因。这些为食管癌基因靶向治疗奠定了基础, 下一步我们将利用双歧杆菌介导Beclin

1开展治疗原位小鼠食管癌的研究, 并对其治疗效果进行综合评价, 为其应用于临床奠定理论和实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Siersema PD, Vleggaar FP. Esophageal strictures, tumors, and fistulae: Alternative techniques for palliating primary esophageal cancer. *Tech Gastrointest Endosc* 2010; 12(4): 203-9.
- 2 邹小农. 食管癌流行病学. *中华肿瘤防治杂志*(Zou Xiaonong. Esophageal cancer epidemiology. *Chin J Cancer Prev Treat* 2006; 13(18): 1-4.
- 3 Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: Molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2005; 12(suppl 12): 1542-52.
- 4 Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12): 2445-62.
- 5 Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: A double edged sword. *Science* 2004; 306(5698): 990-5.
- 6 Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402(6762): 672-6.
- 7 Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 2005; 1(2): 66-74.
- 8 Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999; 59(1): 59-65.
- 9 Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1809-20.
- 10 Chen Y, Lu Y, Lu C, Zhang L. Beclin-1 expression is a predictor of clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma and correlated to hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha expression. *Pathol Oncol Res* 2009; 15(3): 487-93.
- 11 Gaytan M, Morales C, Sanchez-Criado JE, Gaytan F. Immunolocalization of beclin 1, a bcl-2-binding, autophagy-related protein, in the human ovary: Possible relation to life span of corpus luteum. *Cell Tissue Res* 2008; 331(2): 509-17.
- 12 Jiang ZF, Shao LJ, Wang WM, Yan XB, Liu RY. Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol Biol Rep* 2012; 39(1): 159-67.
- 13 Martinet W, de Meyer GR, Andries L, Herman AG, Kockx MM. *In situ* detection of starvation induced autophagy. *J Histochem Cytochem* 2006; 54(1): 85-96.
- 14 Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132(1): 27-42.
- 15 Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(12): 961-7.
- 16 Sinha S, Levine B. The autophagy effector beclin 1: A novel BH3-only protein. *Oncogene* 2008; 27(suppl 1): S137-48.