

消化系肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002581

结肠腺癌中 eIF2c 的表达及与细胞凋亡的关系

刘爱东¹, 唐 慧¹, 庞久玲², 闫 丰¹

(1. 华北理工大学附属医院病理科, 唐山 063000; 2. 唐山市工人医院烧伤科, 唐山 063000)

【摘要】目的:检测结肠腺癌组织中真核翻译起始因子 2c(eukaryotic translation initiation factor 2c, eIF2c)的表达, 分析其与细胞凋亡的关系。**方法:**以 69 例结肠腺癌患者为研究对象, 留取肿瘤组织为观察组, 留取正常结肠黏膜组织为对照组。应用免疫组化法检测 eIF2c、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达, 应用 Western blot 检测 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, BAX)的表达。构建过表达 eIF2c 结肠癌 SW480 细胞系, 应用 Western blot 检测 BAX 的表达。**结果:**2 组中 eIF2c 的阳性率差别有统计学意义(56.5% vs. 13.0%, $\chi^2=28.750$, $P=0.000$)。eIF2c 在不同肿瘤最大径(68.1% vs. 31.8%, $\chi^2=8.021$, $P=0.005$)、浸润深度(81.2% vs. 35.1%, $\chi^2=14.849$, $P=0.001$)、有无坏死(48.0% vs. 78.9%, $\chi^2=5.366$, $P=0.021$)、淋巴结转移(83.3% vs. 42.2%, $\chi^2=10.765$, $P=0.001$)和癌栓(87.5% vs. 47.2%, $\chi^2=8.134$, $P=0.004$)的分组中, 差异有统计学意义。eIF2c 与 Caspase-3 呈负相关性($r=-0.69$, $P=0.000$), eIF2c 与 BAX 呈负相关性($r=-0.66$, $P=0.000$)。生存分析显示, eIF2c 与生存时间相关($\chi^2=14.00$, $P=0.000$)。过表达 eIF2c 结肠癌细胞系中 BAX 表达下降。**结论:**eIF2c 在结肠腺癌中高表达, 与临床病理特征和预后相关, eIF2c 异常表达与凋亡因子有关联。

【关键词】结肠腺癌; 真核翻译起始因子 2c; 凋亡; 预后**【中图分类号】**R73**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-01-31

Expression of eukaryotic translation initiation factor 2c and its relationship with apoptosis in colorectal adenocarcinoma

Liu Aidong¹, Tang Hui¹, Pang Jiuling², Yan Feng¹

(1. Department of Pathology, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital;

2. Department of Burn, Tangshan Gongren Hospital)

【Abstract】Objective: To detect the expression of eukaryotic translation initiation factor 2c (eIF2c) in colorectal adenocarcinoma and to analyze its relationship with apoptosis. **Methods:** A total of 69 patients with colorectal adenocarcinoma were taken as the study object. Tumor tissue was taken as the observation group and normal colonic mucosa tissue was taken as the control group. The expressions of eIF2c and Caspase-3 were detected by immunohistochemistry method. Expression of Bcl-2 associated X protein (BAX) was detected by Western blot. Colon cancer SW480 cell line of overexpression eIF2c was constructed and expression of BAX was detected by Western blot. **Results:** Differences of positive rate in two groups was statistically significant (56.5% vs. 13.0%, $\chi^2=28.750$, $P=0.000$). Expression of eIF2c was significantly different in maximum diameter (68.1% vs. 31.8%, $\chi^2=8.021$, $P=0.005$), invasion depth (81.2% vs. 35.1%, $\chi^2=14.849$, $P=0.001$), necrosis (48.0% vs. 78.9%, $\chi^2=5.366$, $P=0.021$), lymph node metastasis (83.3% vs. 42.2%, $\chi^2=10.765$, $P=0.001$) and tumor thrombus (87.5% vs. 47.2%, $\chi^2=8.134$, $P=0.004$). Negative correlation was found between eIF2c and Caspase-3 ($r=-0.69$, $P=0.000$), and eIF2c and Bax ($r=-0.66$, $P=0.000$). According to survival analysis, eIF2c was related with survival time ($\chi^2=14.00$, $P=0.000$). Expression of BAX was decreased in colon cancer cell line of overexpressed eIF2c. **Conclusion:** Higher expression of eIF2c is related with clinicopathological features and prognosis in colorectal adenocarcinoma. Abnormal expression of eIF2c is related with apoptosis factors.

【Key words】colorectal adenocarcinoma; eukaryotic translation initiation factor 2c; apoptosis; prognosis

作者介绍: 刘爱东, Email: liuaidong303@163.com,

研究方向: 肿瘤分子病理学。

基金项目: 河北省卫健委 2020 年度医学科学研究课题计划资助项目

(编号: 20200135); 唐山市科学技术研究与发展计划资助项目 (编号: 19150207E)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200619.1523.020.html>
(2020-06-22)

结肠腺癌是高增殖、低凋亡的肿瘤, 病变形成及进展中受相关基因的调控^[1]。近年研究认为, 真核翻译起始因子家族相关成员对调控肿瘤细胞的增殖和凋亡有一定价值。既往观察了真核翻译起始因子 2a(eukaryotic translation initiation factor 2a, eIF2a)在肿瘤中的表达, 发现了其对肿瘤细胞增殖和凋

亡的调控作用^[2]。真核翻译起始因子 2c(eukaryotic translation initiation factor 2c, eIF2c)是家族中的新成员^[3-4],与 eIF2a 的结构有 80%的同源性。相关文献显示, eIF2c 对下游细胞的增殖和凋亡有重要调控作用。为了明确 eIF2c 的作用特征,本研究基于结肠腺癌进行相关实验设计并开展前瞻性实验研究,探讨其临床意义及与凋亡相关指标的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2012 年 1 月至 2014 年 11 月在华北理工大学附属医院诊断为结肠腺癌并行手术根治的患者作为研究对象。纳入标准:①经病理医师确诊,符合 WHO 中的标准^[5];②首次确诊并进行手术治疗。排除标准:①有恶性肿瘤病史者;②术前放疗、化疗者;③林奇综合征;④家属不同意观察者。共观察 69 例,留取术后肿瘤组织为观察组,留取距肿物边缘>3 cm 的正常结肠黏膜组织为对照组。研究经医院伦理委员会批准,符合《赫尔辛基宣言》要求,患者或家属均签定知情同意书。

1.2 样本量评估

应用公式 $n_1=n_2=2[(u_\alpha+u_\beta)/\delta/\sigma]^2+1/4u_\alpha^2$ 进行评估,依据预实验中 eIF2c 表达的阳性率并参考相关文献。拟对照组中的阳性率为 10%,肿瘤中的阳性率为 45%,拟 $\sigma=35$, $\delta/\sigma=0.58$, α 取 0.05,计算 $n_1=n_2\approx 69$ 例。

1.3 细胞株

选择人结肠癌细胞系 SW480 (购自中国科学院细胞库)进行研究。在胎牛血清中培养,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中,细胞呈贴壁生长。接种前密度约为 5 000 个/cm²。

1.4 方法

1.4.1 免疫组化检测 应用免疫组化法检测 2 组 eIF2c、观察组半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达。基于石蜡包埋组织,兔抗人 eIF2c 多克隆抗体购自北京百诺威生物技术有限公司、兔抗人 Caspase-3 多克隆抗体(RLC0006)购自苏州睿赢生物技术有限公司,均为浓缩液,先行预实验,选择显色最理想的浓度(eIF2c 为 1:150、Caspase-3 为 1:200)用于正式实验,DAB 显色。操作均由同一实验师完成,一次性完成实验,做好质控工作。结果判读均由病理医师完成,eIF2c、Caspase-3 的显色部位是细胞质和(或)细胞膜,以浅黄色到棕黄色定为阳性。着色强度以无色、浅黄色、黄色、棕黄色分别计为 0、1、2、3 分。选择 3 个热点区的高倍视野(400 倍)进行观察,取平均值,以阳性百分率<5%、5%~25%、26%~50%、51%~75%、>75%分别计为 0、1、2、3、4 分,上述分值相加为最终评分,总分 0~7 分,以≤3 分为阴性,以>3 分为阳性,计算阳性率。

1.4.2 Western blot 检测 应用 Western blot 检测 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, BAX)的半定量表达。基于新鲜组织,内参应用 GAPDH。首先提取蛋白,测

量蛋白浓度后严格按实验步骤操作,并应用化学发光剂显影。灰度分析应用 Image J V1.47 H 软件,以蛋白与 GAPDH 的比值分析结果。

1.4.3 构建重组质粒 应用 Premier 5.0 分析出序列不包含的酶切位点。实验应用的酶切位点是 BamH I,选择 pEGFP-N1 构建 eIF2c 过表达的载体,提取质粒 DNA 后进行细胞转染。将 pEGFP-NC、pEGFP-eIF2c 质粒分别转入 SW480 细胞中,分别建立空白对照组、空载体转染组及 eIF2c 转染组。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。一般正态计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表达,非正态计量资料用 $M_d(P_{25}, P_{75})$ 表示,计数资料用率、构成比等形式表达,应用 t 检验、方差分析(SNK 法行两两比较)、卡方检验,相关分析应用 Pearson 相关分析,并应用 K-M 生存分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 基线资料

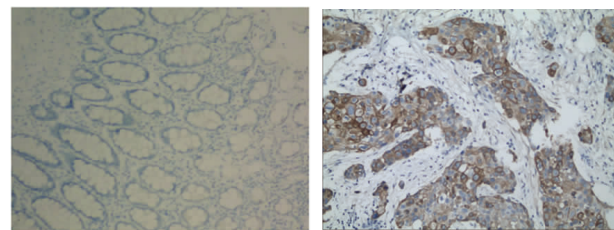
本组共 69 例患者,其中男 35 例,女 34 例,年龄 36~88 岁,中位年龄 59 岁,肿瘤最大径 0.9~13.2 cm,有淋巴结转移 24 例,无淋巴结转移 45 例,有癌栓 16 例,无癌栓 53 例,伴坏死 19 例,无坏死 50 例。

2.2 2 组中 eIF2c 阳性率比较

观察组中 eIF2c 的阳性率(56.5%)明显高于对照组(13.0%),差别有统计学意义($\chi^2=28.750, P=0.000$) (表 1、图 1)。

表 1 2 组 eIF2c 阳性率的比较(n, %)

组别	阳性	阴性	χ^2 值	P 值
观察组(n=69)	39(56.5)	30(43.5)	28.750	0.000
对照组(n=69)	9(13.0)	60(87.0)		



A. 正常结肠黏膜中阴性表达

B. 结肠腺癌中阳性表达

图 1 eIF2c 的表达(IHC, 200×)

2.3 eIF2c 在结肠腺癌不同临床病理特征分组中的比较

eIF2c 在不同肿瘤最大径、浸润深度、坏死、淋巴结转移及癌栓的分组中,差异有统计学意义。而在不同性别、年龄的分组中,差异无统计学意义(表 2、图 2)。

2.4 eIF2c 与 Caspase-3 的相关性

免疫组化检测 Caspase-3 的表达范围是 5%~60%,平均为 35%。相关分析显示两者具有负相关性($r=-0.69, P=0.000$) (图 3)。

表 2 eIF2c 在结肠腺癌不同临床病理特征分组中的比较 (n, %)

分组	eIF2c		χ^2 值	P 值
	阳性	阴性		
年龄/岁			1.647	0.199
≤60(n=29)	19(65.5)	10(34.5)		
>60(n=40)	20(50.0)	20(50.0)		
性别			1.827	0.176
男(n=35)	17(48.6)	18(51.4)		
女(n=34)	22(64.7)	12(35.3)		
最大径/cm			8.021	0.005
≤5(n=22)	7(31.8)	15(68.2)		
>5(n=47)	32(68.1)	15(31.9)		
坏死			5.366	0.021
有(n=50)	24(48.0)	26(52.0)		
无(n=19)	15(78.9)	4(21.1)		
癌栓			8.134	0.004
无(n=53)	25(47.2)	28(52.8)		
有(n=16)	14(87.5)	2(12.5)		
浸润深度			14.849	0.001
未及浆膜(n=37)	13(35.1)	24(64.9)		
浆膜及以外(n=32)	26(81.2)	6(18.8)		
淋巴结转移			10.765	0.001
无(n=45)	19(42.2)	26(57.8)		
有(n=24)	20(83.3)	4(16.7)		

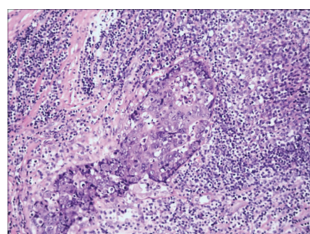


图 2 淋巴结转移癌 (HE, 200 ×)

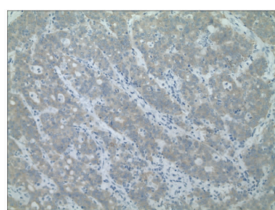
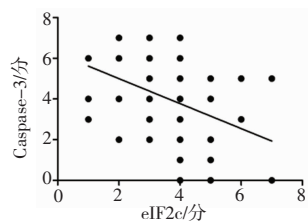
A. Caspase-3 的表达
(IHC, 200 ×)B. eIF2c 与 Caspase-3 相关
分析的散点图

图 3 eIF2c 与 Caspase-3 的相关性

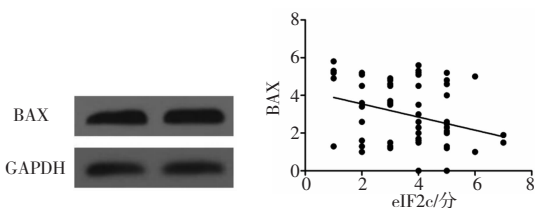
2.5 eIF2c 与 BAX 的相关性

Western blot 检测 BAX 的半定量表达范围是 1.5~5.8, 平均为 3.9。相关分析显示两者具有负相关性($r=-0.66, P=0.000$) (图 4)。

2.6 eIF2c 的表达与生存时间的关系

患者均进行术后 5 年 (60 个月) 随访, 截止时间点为 2019 年 11 月 30 日。其中死亡 40 例, 存活 25 例, 失访 4 例。

死亡患者生存时间为 7~60 个月, 中位生存期为 29 个月。生存分析显示 eIF2c 与生存时间有关($\chi^2=14.00, P=0.000$) (图 5)。



A. BAX 的表达 (Western blot) B. eIF2c 与 BAX 相关分析的散点图

图 4 eIF2c 与 BAX 的相关性

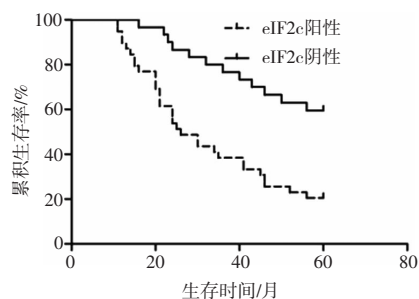


图 5 eIF2c 表达的生存分析图

2.7 不同组别细胞系中 BAX 的表达

eIF2c 转染组中 BAX 的表达 (0.87 ± 0.12) 明显低于空载体转染组 (1.11 ± 0.19) 和空白对照组 (1.17 ± 0.19) ($F=3.93, P=0.011$) (图 6)。

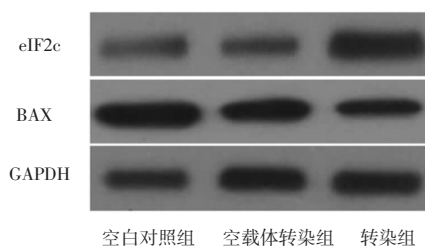


图 6 不同组别细胞系中 BAX 的表达

3 讨论

结肠腺癌是来源于结肠黏膜上皮的恶性肿瘤, 肿瘤具有明显的侵袭性生长特征。部分低分化及浸润出肌层患者的预后差^[6-7]。eIF2 是起始三元复合物 (eIF2·Met-tRNAi·GTP) 的主要组成部分, 也是细胞内调节翻译速率的调节因子之一, 含有 α 、 β 、 γ 3 个亚基^[8], 其中 eIF2c 含有 γ 亚基, 与 eIF1 形成 43S 翻译初始复合物的结构, 可能是进行翻译的第一步。有研究显示, eIF2c 的活性降低将导致蛋白质翻译水平降低, 从而影响基因的调控^[9]。在正常的组织细胞受到外界刺激时, eIF2c 蛋白的表达呈现一过性增加。当刺激因素去除后, eIF2c 蛋白的表达回复正常。

eIF2c 在恶性肿瘤中呈现持续高表达状态,且 eIF2c 的持续高表达能引起上皮细胞发生恶性转变。因此推测 eIF2c 在肿瘤形成过程中可能通过调控细胞增殖、凋亡及细胞迁移发挥生物学作用。eIF2c 在结肠癌中表达尚未见报道。eIF2c 可能是 microRNA 调控的重要靶因子,可能是调控通路最复杂的通路之一。有研究认为,处于 RISC 活性中心的 eIF2c 增加可能选择性地保护 microRNA 不被降解,通过增加 microRNA 作用功效调节促进肿瘤的因子^[10]。eIF2c 过表达可以引起肿瘤的分型改变,同时引起肿瘤生长加速。坏死是结肠腺癌的特点,对于分化差的肿瘤,常具有“永生性”的 DNA 遗传特征。eIF2c 具有阻止肿瘤细胞死亡的作用,使细胞停滞在幼稚状态。这种细胞的核染色深,细胞连接不紧密,易于侵袭和迁移^[11]。

本研究结果显示,eIF2c 在结肠腺癌中的表达明显上调,提示 eIF2c 高表达是肿瘤形成中的重要分子事件。eIF2c 的表达在不同浸润深度、有无癌栓及淋巴结转移的分组中有统计学差异,提示 eIF2c 异常表达参与肿瘤的浸润性生长和细胞迁移。由于以上因素均是肿瘤进展的重要标志,因此 eIF2c 参与肿瘤的进展过程,即 eIF2c 高表达预示着结肠癌处于进展期。研究显示 eIF2c 的表达与肿瘤是否伴有坏死相关,提示 eIF2c 高表达可能对肿瘤细胞死亡有一定的调节作用,即肿瘤性坏死发生率较低。本研究观察到 eIF2c 高表达时肿瘤的体积较大,提示 eIF2c 高表达对促进病变的生长有重要意义。相关分析显示 eIF2c 与细胞凋亡指标具有相关性,提示 eIF2c 可能通过调节细胞凋亡发挥生物学作用。此结论经转染 eIF2c 的结肠癌细胞系中 BAX 高表达得到进一步证实。eIF2c 对凋亡的细胞能进行有效调节,也是 eIF2c 促进肿瘤进展的作用之一,即 eIF2c 高表达可能对抑制凋亡有一定作用,使肿瘤细胞生长加速,并能在一定程度上抑制肿瘤坏死。eIF2c 可能通过桥接因子发挥促肿瘤细胞凋亡的作用,如 microRNA 等^[12]。eIF2c 引起肿瘤细胞的失控性增生,细胞呈几何增长的方式进行扩增,繁殖明显,细胞生长活跃,肿瘤进展快^[13-14]。生存分析证实了 eIF2c 与预后的关系,也明确了 eIF2c 高表达患者的预后差,但是这需要进行多中心、大样本分析后进一步明确。近年也有研究显示,eIF2c 高表达可能与 HER-2 的表达状态相关。由于 HER-2 是肿瘤治疗的靶点,因此 eIF2c 的表达状态可能也具有肿瘤治疗的靶点标记作用^[15]。后续研究进行相关探讨可能对临床治疗有一定价值。

总之,eIF2c 在结肠腺癌中高表达与临床病理特征和预后相关,eIF2c 异常表达与凋亡因子有关联。

参 考 文 献

- [1] Zamorano-Leon JJ, Ballesteros S, de Las Heras N, et al. Effect of pectin on the expression of proteins associated with mitochondrial biogenesis and cell senescence in HT29-human colorectal adenocarcinoma cells[J]. Prev Nutr Food Sci, 2019, 24(2): 187-196.
- [2] 刘时飞, 刘爱东, 宋旭东, 等. 胃腺癌中 eIF2 α 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(6): 668-670.
- [3] Lugli G, Larson J, Martone ME, et al. Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner[J]. J Neurochem, 2005, 94(4): 896-905.
- [4] Sago N, Omi K, Tamura Y, et al. RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2c translation initiation factors are barely expressed[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(1): 50-57.
- [5] 哈密霍恩, 阿尔特南. 消化系统肿瘤病理学和遗传学[M]. 虞积耀, 崔全才, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 124-132.
- [6] Melas PA, Qvist JS, Deidda M, et al. Cannabinoid modulation of eukaryotic initiation factors (eIF2 α and eIF2B1) and behavioral cross-sensitization to cocaine in adolescent rats[J]. Cell Rep, 2018, 22(11): 2909-2923.
- [7] Hu YL, Yin Y, Liu HY, et al. Glucose deprivation induces chemoresistance in colorectal cancer cells by increasing ATF4 expression[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(27): 6235-6245.
- [8] Koromilas AE. Roles of the translation initiation factor eIF2 α serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849(7): 871-880.
- [9] Zhang Z, Zhang G, Kong C, et al. EIF2C, Dicer, and Drosha are up-regulated along tumor progression and associated with poor prognosis in bladder carcinoma[J]. Tumour Biol, 2015, 36(7): 5071-5079.
- [10] Doi N, Zenno S, Ueda R, et al. Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2 translation initiation factors[J]. Curr Biol, 2003, 13(1): 41-46.
- [11] Chang SS, Smith I, Glazer C, et al. eIF2c is overexpressed and amplified in head and neck squamous cell carcinoma[J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2010, 72(6): 337-343.
- [12] Hausser J, Landthaler M, Jaskiewicz L, et al. Relative contribution of sequence and structure features to the mRNA binding of Argonaute/eIF2c-miRNA complexes and the degradation of miRNA targets[J]. Genome Res, 2009, 19(11): 2009-2020.
- [13] Ren K, Gou X, Xiao M, et al. Pim-2 cooperates with downstream factor XIAP to inhibit apoptosis and intensify malignant grade in prostate cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2019, 25(1): 341-348.
- [14] Qiao Q, Sun C, Han C, et al. Endoplasmic reticulum stress pathway PERK-eIF2 α confers radioresistance in oropharyngeal carcinoma by activating NF- κ B[J]. Cancer Sci, 2017, 108(7): 1421-1431.
- [15] Tantiwettrueangdet A, Panvichian R, Wongwaisayawan S, et al. Droplet digital PCR using HER2/eIF2c1 ratio for detection of HER2 amplification in breast cancer tissues[J]. Med Oncol, 2018, 35(12): 149.

(责任编辑:唐秋姗)