

网络出版时间:2023-04-21 10:58:19 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230420.1340.016.html

## eIF2B1 在肝细胞癌中的表达及意义

齐文月<sup>1</sup>, 周大臣<sup>2</sup>, 张振华<sup>1</sup>, 夏国美<sup>1</sup>, 陈伟<sup>2</sup>, 邹桂舟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探究真核细胞翻译起始因子 2B1 (eIF2B1) 在肝细胞癌 (HCC) 中的表达与其临床预后的相关性。方法 通过对标本库中 743 例 HCC 患者的临床数据进行随访, 筛选出 91 例具有完整随访信息的与乙型肝炎病毒 (HBV) 相关的 HCC 患者, 选择其术后肿瘤组织, 同时留取距肿物边缘 > 2 cm 的癌旁组织, 制作为组织芯片, 进行 Western blot 和免疫组化实验, 使用 Image J 分析组织芯片染色的阳性细胞比例及 Western blot 结果的灰度值, 通过 R4.0.5 软件对纳入患者的临床数据和随访数据进行统计学分析。结果 免疫组化结果提示相对于癌旁组织中的表达, eIF2B1 在肿瘤组织中的表达效果更强。Western blot 结果显示, 与 HepG2 细胞比较, eIF2B1 在 HepG2.2.15 细胞中表达更强, HCC 组织中 eIF2B1 的表达与肿瘤数目相关 ( $P < 0.05$ )。Cox 多因素回归

分析结果显示, eIF2B1 的表达是 HBV-DNA 阳性患者总体临床预后的独立危险因素 ( $HR = 4.28, P = 0.018$ )。结论 在 HBV 相关的 HCC 组织中, eIF2B1 的表达显著增强且与 HBV DNA 阳性的患者的整体生存显著相关。

**关键词** 肝细胞癌; 乙型肝炎病毒; eIF2B1; eIF2 $\alpha$ ; 蛋白质翻译; 预后

**中图分类号** R 735.7

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0799-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.016

原发性肝癌是全球第六大癌症, 居全世界癌症相关病死率的第三位<sup>[1]</sup>。在我国, 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的肝癌类型, 占总病例的 85% ~ 90%<sup>[2]</sup>。肝癌由于其起病隐匿, 早期易漏诊, 大多数患者确诊时已处于疾病的中晚阶段, 预后不佳, 发现并研究新的分子靶点, 是当前 HCC 的研究热点内容之一。近年来的研究<sup>[3]</sup>发现, 蛋白质翻译的调控在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的作用, 但是在 HCC 中, 目前还缺少足够的研

2023-01-04 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1608085MH162)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院<sup>1</sup> 肝病科、<sup>2</sup> 肝胆外科, 合肥 230601

作者简介: 齐文月, 女, 硕士研究生;

邹桂舟, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ayzou-guizhou@sina.com

its effect on expression of inflammation factors in LPS-induced RAW264.7 cells, as well as on the proliferation and apoptosis of RAW264.7 cells. **Methods** The NUP85 gene was amplified by PCR to construct pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 eukaryotic expression plasmid. The pcDNA3.1-3 × Flag-c vector was divided with enzymes. The purified PCR product was ligated with the vector, and the ligated product was transformed into bacterial competent cells. After identification by enzyme digestion, sequencing and analysis were performed. Then, it was transfected into RAW264.7 cells, and the blank plasmid without NUP85 gene was set as the control group. The effect on cell proliferation and apoptosis were detected by CCK-8 assay and flow cytometry, and the expression of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in LPS-induced RAW264.7 cells was detected by Western blot and ELISA. **Results** Enzyme digestion identification and Western blot results showed that pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 eukaryotic expression plasmid was successfully constructed and expressed. The results of CCK-8 assay showed that the cell survival rate of NUP85 overexpression group was significantly lower than that of control group after 24 h [ (0.55 ± 0.03) vs (0.67 ± 0.05),  $F = 30.98, P < 0.05$  ]. The results of flow cytometry showed that the cell apoptosis rate of NUP85 overexpression group was higher than that of control group [ (15.78 ± 1.05)% vs (13.40 ± 0.47)%,  $F = 75.38, P < 0.05$  ]. The results of Western blot and ELISA showed that after transfection of pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85, the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in RAW264.7 cells were higher than those in the control group, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** NUP85 can inhibit the proliferation and promote apoptosis in LPS-stimulated RAW264.7 cells, and NUP85 can promote the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

**Key words** NUP85; RAW264.7 cells; proliferation; apoptosis; TNF- $\alpha$ ; IL-6

究数据。蛋白质的翻译过程主要包括起始、延长和终止 3 个步骤,其中翻译的起始阶段被认为是蛋白质合成中重要的限速步骤,起始因子(translation initiation factor, eIFs)通过调控遗传密码来影响蛋白质的翻译,其中发挥重要作用的有 eIF2、eIF2B、eIF4F 复合物等。eIF2 与 eIF4F 复合物是蛋白质翻译过程中两个关键调控点,前期研究<sup>[4]</sup>表明 eIF4F 复合物对 HCC 患者有一定的预后价值,但目前关于 eIF2B1 在 HCC 中表达的研究较少。基于此背景,该研究致力于探讨 eIF2B1 在 HCC 中的表达及其临床意义。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 胎牛血清购自美国 Gibco 公司;一抗 eIF2B1、eIF2 $\alpha$ 、P-eIF2 $\alpha$  购自美国 CST 公司;山羊抗兔或抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;HCC 细胞系 HepG2 和 HepG2. 2. 15 购自中国科学院上海细胞库,其中 HepG2 细胞指人肝癌细胞, HepG2. 2. 15 是指稳定转染了 HBV DNA 的人肝癌细胞;BCA 试剂盒和 4% 多聚甲醛购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 临床数据的收集与分析** 从安徽医科大学第二附属医院现有的 HCC 组织标准库中,筛选出 91 例具有完整随访信息的,且与乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)相关的 HCC 术后患者的配对临床组织(包括肿瘤组织以及距肿物边缘 > 2 cm 的癌旁组织),制作 4 套组织芯片(tissue microarray, TMA1~4)。所纳入 HCC 患者的标准:① 首次病理确诊为 HCC;② 患者有乙型肝炎病史,首次诊断为 HCC 且年龄 18~70 岁;③ 术前未行放疗、化疗及相关抗肿瘤治疗。排除标准:① 混合型肝癌或合并其他肝脏恶性肿瘤;② 既往或同期伴有其它脏器恶性肿瘤,包括复发性 HCC;③ 合并自身免疫系统疾病的患者;④ 临床病理资料不完整患者。随访通过与患者或患者家属的联系来保持对出院患者病情的追踪,具体内容包括:① 患者入院以来的肝功能指标;② 术后病理报告的肿瘤的大小、数目以及卫星灶;③ 出院之后的 3 年生存率和 5 年生存率以及生存状态等。该研究已通过安徽医科大学第二附属医院伦理委员会审查(编号:20200863)

**1.2.2 免疫组织化学** 将组织芯片在 60℃ 烘箱中烤片、脱蜡,然后将烤好的芯片依次放入二甲苯 I 6 min,二甲苯 II 6 min,二甲苯与无水乙醇 3 min,无

水乙醇 6 min,90% 乙醇 3 min,70% 乙醇 3 min,50% 乙醇 3 min,纯水 10 min 梯度脱蜡;再将脱蜡完毕后的芯片放入装有枸橼酸钠缓冲液的染色槽内,在微波炉中进行抗原修复;将芯片浸入 30% 过氧化氢与甲醇 1:9 体积混合的混合液中 10 min,以封闭过氧化氢酶,用 PBS 冲洗 15 min;破膜液破膜 10 min, PBS 冲洗 15 min;用 1% 牛血清白蛋白封闭 2 h;组织芯片与第一抗体在 4℃ 环境下孵育过夜;室温下依次加入反应增强液 20 min、辣根酶标记抗兔 IgG 聚合物 30 min,以 DAB 为显色剂,苏木精 5 s 复染,最后用将切片放入 50% 乙醇 3 min,70% 乙醇 3 min,90% 乙醇 3 min,无水乙醇 6 min,二甲苯与无水乙醇 3 min,二甲苯 I 6 min,二甲苯 II 6 min 脱水,中性树脂封片。操作严格按照实验步骤完成,做好质控工作。染色判断标准为:eIF2B1 主要在细胞质和细胞膜上显色,以浅黄到棕黄色定为阳性。以无染色、浅黄色、深黄色、黄褐色分别计为 0、1、2、3 分。通过用 Image J 软件进行半定量分析计算阳性细胞比例,阳性率 < 5% 计为 0 分,5%~25% 计为 1 分, > 25%~50% 计为 2 分, > 50%~75% 计为 3 分, > 75% 计为 4 分,两项分值相加为最终评分,总分 0~7 分,以  $\leq 3$  分为低表达,以 > 3 分为高表达。

**1.2.3 Western blot 检测** HepG2 和 HepG2. 2. 15 细胞分别培养 48 h 后,吸去培养液,PBS 洗 3 遍。加入已经配制好的蛋白裂解液 100  $\mu$ l 冰上孵育 25 min;用无菌细胞刮刮下细胞裂解液于无菌的 1.5 ml 离心管,4℃、13 200 r/min 离心 30 min,吸取上清液。采用 BCA 蛋白浓度检测法对其进行定量,随后用上样缓冲液和纯水配成等体积等浓度,10 min 煮沸使其变性后离心,放置冰上冷却。使用 SDS-PAGE 分离总蛋白,并电转移到 PVDF 膜上。转膜后,在室温下用 5% BSA TBST 溶液中封闭 2 h 后,在 4℃ 下与一抗孵育过夜。第 2 天,用山羊抗小鼠二抗或山羊抗兔二抗孵育 1 h,洗膜后用显影仪检测目的蛋白。

**1.3 统计学处理** 使用 R 4.0.5 及 Graphpad Prism 8.0.2 软件对实验数据进行统计分析。患者的临床特征与目标基因的表达水平通过非参数检验分析,组织芯片中各目标基因的表达水平的相关性通过程序包 PerformanceAnalytics 进行分析。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,并通过 Cox 回归分析计算各影响因素的 HR 值,通过 Nomogram 评估各影响因素与 HCC 患者预后的相关性。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 eIF2B1 在 HCC 肝脏组织中的表达及临床特征相关性** 通过对纳入的 HCC 患者的肝脏肿瘤组织中的 eIF2B1 的表达进行半定量分析,统计 eIF2B1 在 HCC 患者中的表达情况。结果显示,肝脏肿瘤组织中 eIF2B1 的表达与 HCC 患者的肿瘤数目有显著统计学相关性 ( $P < 0.05$ ),而与性别、年龄、肿瘤最大径、分期等无显著统计学相关性 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 免疫组化及 Western blot 法检测 eIF2B1 的表

达及与 HCC 患者的整体术后生存时间的相关性

通过 Kaplan-Meier 生存曲线进行生存分析可得出结论,eIF2B1 在 HBV 相关的肝癌中的表达与 HCC 患者总体生存率无明显统计学意义(图 1A,  $P > 0.05$ ),但在 HBV-DNA 阳性患者中,eIF2B1 的表达与 HCC 患者总体临床预后呈现显著相关性(图 1B,  $P < 0.05$ ),eIF2B1 高表达组总体生存率要低于 eIF2B1 低表达组;通过 IHC 染色检测及 Western blot 法检测 HBV-DNA 阳性的 HCC 肿瘤组织和癌旁肝组织中 eIF2B1 的表达进一步证实了该结果(图 1C、D)。

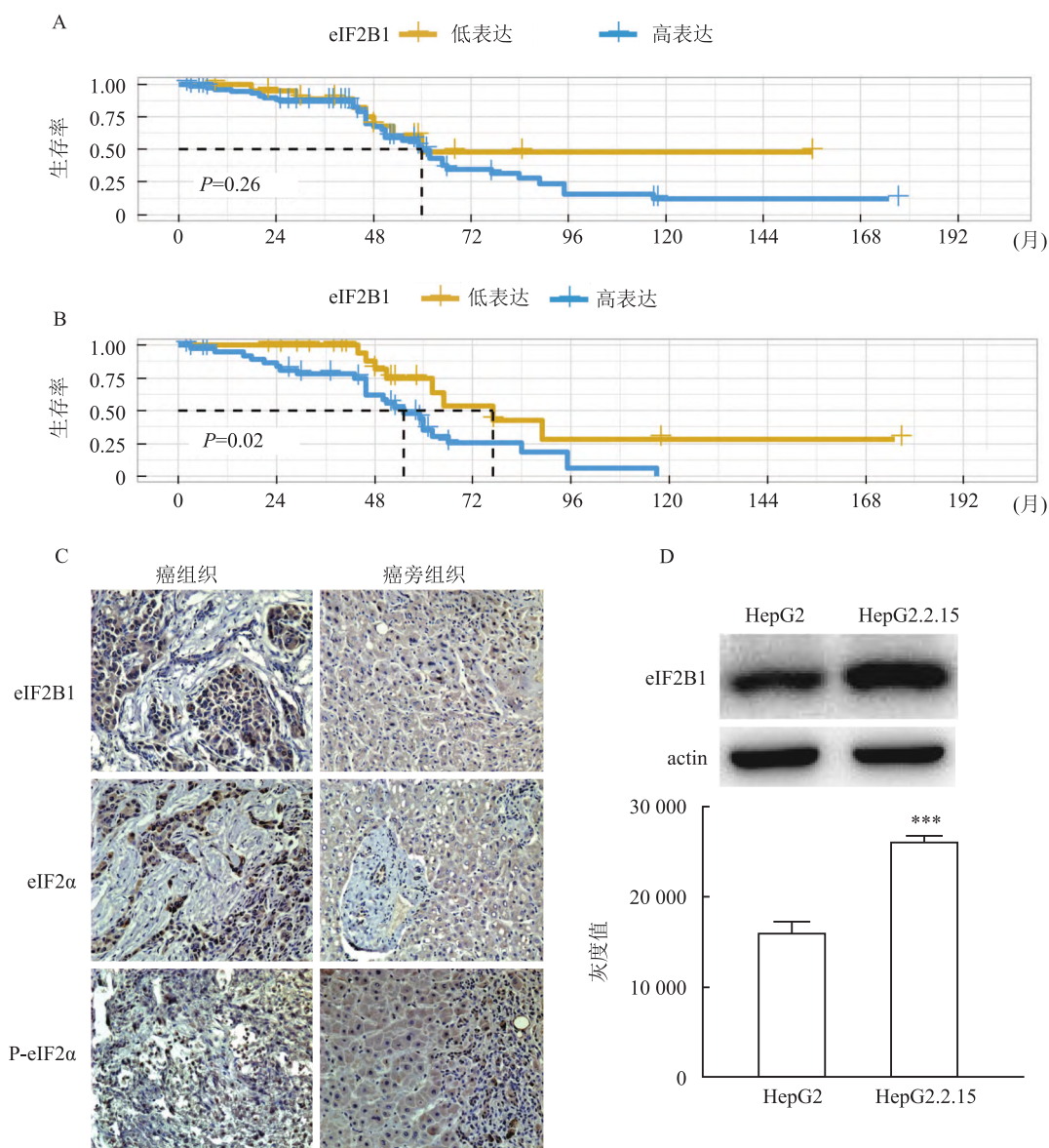


图1 eIF2B1 的表达与 HCC 患者的整体术后生存时间的相关性

A:eIF2B1 在 HCC 中的表达与总体生存率的关系;B:在 HBV-DNA 阳性患者中,eIF2B1 在 HCC 中的表达与总体生存率的关系;C:eIF2B1、eIF2α 及 P-eIF2α 在 HBV-DNA 阳性患者的肝癌细胞及癌旁细胞的免疫组织化学染色结果  $\times 400$ ;D:Western blot 法检测 eIF2B1 在 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞中的表达以及量化分析,与 HepG2 细胞比较:\*\*\*  $P < 0.001$

表1 eIF2B1 在不同临床特征分组中 HCC 肝脏组织表达分析

| 项目                        | eIF2B1 高表达<br>(n=71) | eIF2B1 低表达<br>(n=20) | Z/ $\chi^2$ 值 | P 值   |
|---------------------------|----------------------|----------------------|---------------|-------|
| 性别                        |                      |                      | 0.000         | 1.000 |
| 男                         | 65                   | 18                   |               |       |
| 女                         | 6                    | 2                    |               |       |
| 年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )   | 52.30 $\pm$ 11.09    | 48.65 $\pm$ 10.95    | -0.835        | 0.404 |
| 随访时间(月, $\bar{x} \pm s$ ) | 70 $\pm$ 29.45       | 19 $\pm$ 25.26       | -0.506        | 0.613 |
| 饮酒史                       |                      |                      | 0.388         | 0.533 |
| 有                         | 19                   | 4                    |               |       |
| 无                         | 45                   | 14                   |               |       |
| 乙肝家族史                     |                      |                      | 0.000         | 1.000 |
| 有                         | 5                    | 2                    |               |       |
| 无                         | 58                   | 16                   |               |       |
| 肝癌家族史                     |                      |                      | 0.000         | 1.000 |
| 有                         | 8                    | 2                    |               |       |
| 无                         | 55                   | 16                   |               |       |
| HBV-DNA                   |                      |                      | 2.851         | 0.091 |
| 阳                         | 54                   | 12                   |               |       |
| 阴                         | 10                   | 7                    |               |       |
| 抗病毒治疗                     |                      |                      | 0.000         | 1.000 |
| 是                         | 9                    | 2                    |               |       |
| 否                         | 52                   | 15                   |               |       |
| HBeAg                     |                      |                      | 0.863         | 0.353 |
| 阳                         | 64                   | 15                   |               |       |
| 阴                         | 7                    | 4                    |               |       |
| 合并肝硬化                     |                      |                      | 0.874         | 0.350 |
| 是                         | 45                   | 11                   |               |       |
| 否                         | 17                   | 7                    |               |       |
| 肿瘤最大径(cm)                 |                      |                      | 0.235         | 0.628 |
| >5                        | 35                   | 11                   |               |       |
| $\leq 5$                  | 29                   | 7                    |               |       |
| 肿瘤数目                      |                      |                      | -             | 0.041 |
| >3                        | 0                    | 2                    |               |       |
| $\leq 3$                  | 65                   | 15                   |               |       |
| 微血管侵犯                     |                      |                      | 0.000         | 1.000 |
| 是                         | 11                   | 3                    |               |       |
| 否                         | 24                   | 6                    |               |       |
| 包膜完整                      |                      |                      | 0.000         | 1.000 |
| 是                         | 43                   | 10                   |               |       |
| 否                         | 7                    | 1                    |               |       |
| 肿瘤 TNM 分期                 |                      |                      | 0.043         | 0.836 |
| I ~ II                    | 46                   | 14                   |               |       |
| III ~ IV                  | 15                   | 4                    |               |       |

本研究纳入的患者入院时间主要是 2000—2014 年,由于当时条件及技术原因,部分指标的数据纳入不全

**2.3 eIF2B1 与 eIF2 $\alpha$ 、P-eIF2 $\alpha$  及临床特征之间的相关性分析** 相关性分析提示 eIF2B1 在 HBV 相关的 HCC 细胞中的表达与 P-eIF2 $\alpha$  的表达及肿瘤的数目、大小之间呈负相关(图 2A、B)。通过 Western blot 法检测 HepG2. 2. 15 细胞中 eIF2B1 以及相关蛋白的表达,结果发现,与 HepG2 细胞系比较,

HepG2. 2. 15 细胞系中的 eIF2B1 表达水平显著增高,且 eIF2B1 的调控基因,如 eIF2 $\alpha$  以及其磷酸化水平也在两种不同的细胞系中体现出表达差异(图 2C),进一步说明并验证了 eIF2B1 在 HCC 中的表达与 HBV 感染有关。

## 2.4 eIF2B1 在 HBV-DNA 阳性的 HCC 肝脏组织中表达的多因素 Cox 回归分析及 Nomogram 模型

以 Cox 比例风险模型为基础,对 HBV-DNA 阳性患者的临床数据进行多因素 Cox 回归分析,并利用 Nomogram 算法进行评分,对各个危险因素的风险比例分别给予评分,以各患者最终得分综合来预测 3 年生存率和 5 年生存率,例如,得分为 150 分的患者 3 年生存率、5 年生存率分别约为 0.92、0.75。可以看到 eIF2B1 的评分相对较高,提示 eIF2B1 对于 HCC 患者预后生存时间有着显著的相关性。见图 3。

## 3 讨论

本研究发现,eIF2B1 在 HBV-DNA 阳性的 HCC 患者肿瘤组织中的表达与 HCC 患者的临床预后具有显著相关性,提示 eIF2B1 在 HCC 的发生发展过程中具有一定的生物学作用。国内的 HCC 病例主要是由 HBV 感染所致,HBV 感染通过以下 3 种机制促进肿瘤的发展:① HBV DNA 整合到宿主基因组中诱导插入突变;② 由于 HBV DNA 与宿主基因组的整合和病毒蛋白质的活性,导致宿主基因组的不稳定性;③ HBV 蛋白(HBx、HBc 和 preS)影响患者细胞功能、激活致癌通路,与其他危险因素相关的肿瘤比较,HBV 相关的肿瘤具有更高的染色体改变率<sup>[5]</sup>。在本研究中,Western blot 实验结果提示 eIF2B1、eIF2 $\alpha$  以及其磷酸化水平在 HepG2. 2. 15 及 HepG2 细胞系中的表达具有明显差异性,这也表明 HBV 感染会影响基因在肝癌细胞中的表达。

HCC 作为一种高增殖性肿瘤<sup>[6]</sup>,在肿瘤细胞发生发展过程中涉及到多种基因的突变,蛋白质的翻译在病变过程中起到重要的作用。翻译的起始阶段是其中重要的限速环节,涉及到多种起始因子(eIFs),其中 eIF2 是一种  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚基组成的 GTP 酶(GTPase),可被 eIF2B 激活<sup>[7]</sup>。eIF2B 是一个异源十聚体复合体,由  $\alpha$  到  $\varepsilon$  5 个亚基组成,分别由 5 个不同的基因 eIF2B1 ~ eIF2B5 编码,位于不同的染色体上<sup>[8]</sup>。当发生病毒感染或在其他不同胁迫条件下,通过激活 GCN2、PERK、PKR 和 HRI 这四种激酶,使 eIF2 $\alpha$  亚基的 Ser51 发生磷酸化,磷酸化的 eIF2 更强烈地结合并抑制 eIF2B,阻止非磷酸化的

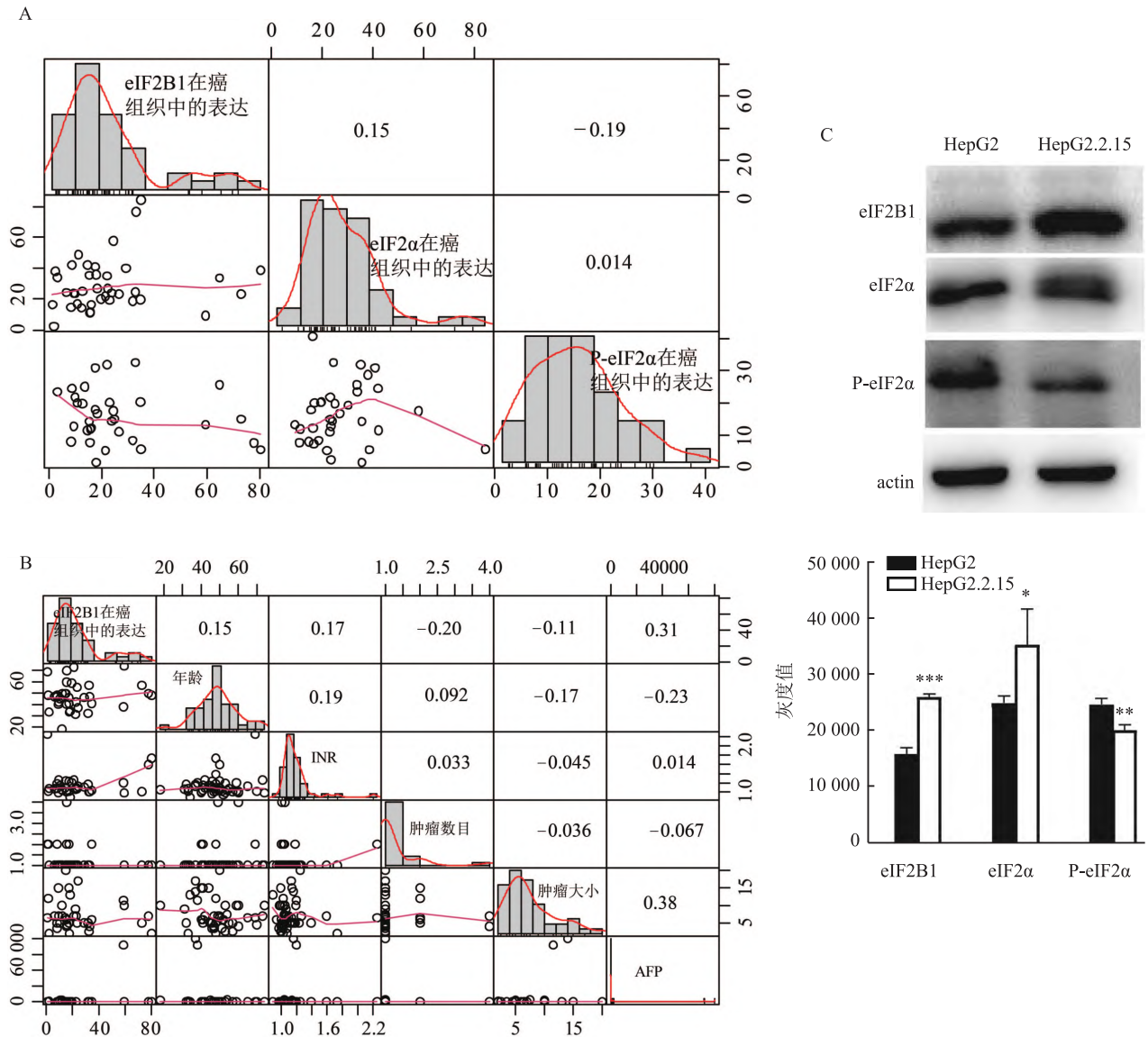


图2 eIF2B1 与 eIF2α、P-eIF2α 及临床特征之间的相关性分析

A: eIF2B1 与 eIF2α、P-eIF2α 之间的相关性分析; B: eIF2B1 与临床特征之间的相关性; C: Western blot 法检测 eIF2B1 与 eIF2α、P-eIF2α 在 HepG2 及 HepG2.2.15 细胞中的表达, 与 HepG2 细胞比较; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

eIF2 的循环<sup>[9]</sup>, 从而导致蛋白质合成的抑制。eIF2α 的磷酸化激活可影响肿瘤细胞的生长和抗肿瘤治疗的疗效, 在很多恶性肿瘤中 eIF2α 的表达增强, 且肿瘤细胞的增殖与 eIF2α 的持续高表达有明显的相关性<sup>[7,10]</sup>。在本研究中, eIF2α 在 HCC 肿瘤组织中呈高表达状态, 且与 eIF2B1 的表达呈正相关, 这也侧面验证了该结论。eIF2B 是 eIF2 特有的鸟嘌呤核苷酸交换因子, 通过将释放的 eIF2-GDP 循环到活跃的 eIF2-GTP, 并招募 Met-tRNA 形成新的 eIF2-GTP · Met-tRNA 三元复合物, 这也是翻译起始阶段持续成功的关键, eIF2B 比 eIF2α 少 3 ~ 5 倍, 凸显了调节 eIF2B 活性的重要性<sup>[11]</sup>。目前对于

eIF2B 的研究主要在蛋白质溶解性白质脑病, 也被称为“中枢神经系统髓鞘减少的儿童共济失调”, 在 eIF2B1 ~ 5 基因中, 任何一个基因突变均可导致蛋白质溶解性白质脑病。在编码 eIF2B 的 5 个基因中, 目前对 eIF2B5 研究较多, Hou et al<sup>[12]</sup>通过分析癌症基因组图谱中 eIF2B5 在卵巢癌患者中的表达来评估预后意义, 结果显示 eIF2B5 低表达是卵巢癌患者预后不良的独立危险因素。此外, 研究表明 eIF2B5 在肺癌和乳腺癌中高表达<sup>[13-14]</sup>, 同时也是大肠癌病情进展的生物标志物<sup>[15]</sup>。eIF2Bα 表达水平不足会降低 eIF2B 的活性, 但关于 eIF2B1 在 HCC 中的研究, 目前还缺少足够的研究数据。在本研究中, 通过

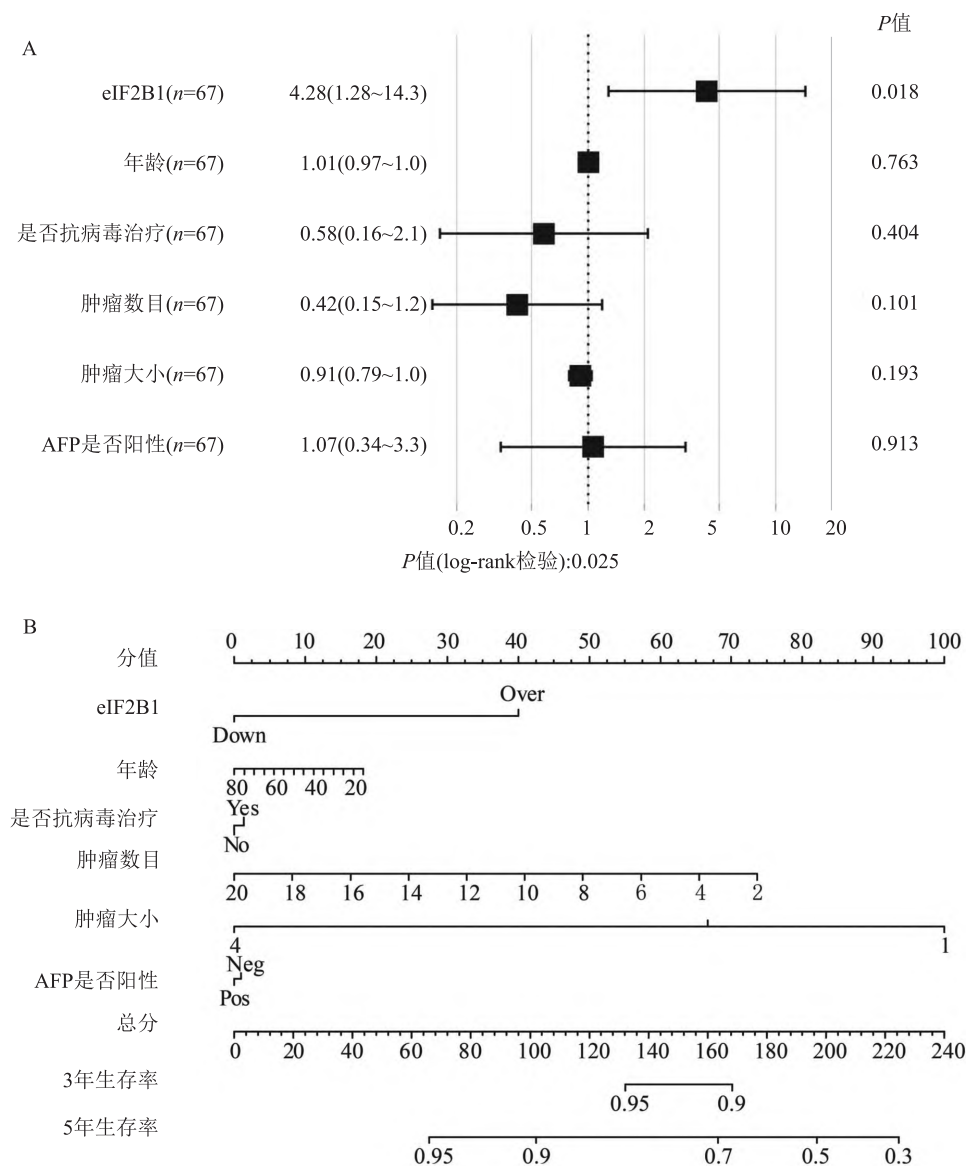


图3 多因素Cox回归分析及列阵图模型

A: eIF2B1在HBV-DNA阳性的HCC肝脏组织中表达的Cox比例风险模型; B: 基于Cox比例风险模型绘制的列阵图(Nomogram)

对 eIF2B1 与 eIF2 $\alpha$ 、P-eIF2 $\alpha$  之间相关性的分析,表明 eIF2B1 与 P-eIF2 $\alpha$  之间呈负相关,eIF2B1 在 HCC 肝脏组织中的表达强于癌旁组织,且通过生存分析也提示在 HBV-DNA 阳性患者中,低表达组相较于高表达组有更好的生存率,提示 eIF2B1 在 HBV 相关的 HCC 发生发展过程中起到了一定的生物学作用。同时,本研究尚存在一些局限性,样本量的不足给本研究带来一定的影响,同时也导致诸多推测无法进一步实验验证。后续课题组将收集更多的标本数据,通过进一步的体内与体外实验,更全面、更深入地研究 eIF2B1 在 HBV 相关的 HCC 中的作用。

### 参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] Li X, Li C, Zhang L, et al. The significance of exosomes in the development and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 1.
- [3] Ali S Z, Langden S S S, Munkhzul C, et al. Regulatory mechanism of microrna expression in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1723.
- [4] 钱仁哲, 周大臣, 陆子恒, 等. 真核细胞翻译起始复合物 4F 对

- HCC 患者的预后价值[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(11): 1712–7.
- [5] Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of hbv-induced hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1): S84–101.
- [6] Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(5): 505–11.
- [7] Kenner L R, Anand A A, Nguyen H C, et al. Eif2b-catalyzed nucleotide exchange and phosphoregulation by the integrated stress response[J]. *Science*, 2019, 364(6439): 491–5.
- [8] Wortham N C, Proud C G. Biochemical effects of mutations in the gene encoding the alpha subunit of eukaryotic initiation factor (eif) 2b associated with vanishing white matter disease[J]. *BMC Med Genet*, 2015, 19(16): 64.
- [9] Dever T E. Gene-specific regulation by general translation factors[J]. *Cell*, 2002, 108(4): 545–56.
- [10] Koromilas A E. Roles of the translation initiation factor eif2 $\alpha$  serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(7): 871–80.
- [11] Marintchev A, Ito T. Eif2b and the integrated stress response: a structural and mechanistic view[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(13): 1299–308.
- [12] Hou L, Y Jiao, Y Li, et al. Low eif2b5 expression predicts poor prognosis in ovarian cancer[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(5): e18666.
- [13] Xue D, Lu M, Gao B, et al. Screening for transcription factors and their regulatory small molecules involved in regulating the functions of c11-5 cancer cells under the effects of macrophage-conditioned medium[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(3): 1323–33.
- [14] Yang S, Zhang H, Guo L, et al. Reconstructing the coding and non-coding rna regulatory networks of mirnas and mtnas in breast cancer[J]. *Gene*, 2014, 548(1): 6–13.
- [15] Palaniappan A, Ramar K, Ramalingam S. Computational identification of novel stage-specific biomarkers in colorectal cancer progression[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156665.

## Expression and significance of eIF2B1 in hepatocellular carcinoma

Qi Wenyue<sup>1</sup>, Zhou Dacheng<sup>2</sup>, Zhang Zhenhua<sup>1</sup>, Xia Guomei<sup>1</sup>, Chen Wei<sup>2</sup>, Zou Guizhou<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Hepatology, <sup>2</sup>Dept of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the expression of eukaryotic translation initiation factor 2B1 (eIF2B1) in HCC and its correlation with clinical prognosis. **Methods** Through the follow-up of the clinical data of 743 hepatocellular carcinoma patients in the specimen bank, 91 HBV-related liver cancer patients with complete follow-up information were screened out, and their postoperative tumor tissues were selected. Meanwhile, the adjacent tumor tissues with a distance of more than 2 cm from the tumor margin were collected to make tissue chips. Western blot and immunohistochemical experiments were performed. Image J was used to analyze the proportion of positive cells stained by tissue chip and the gray value of Western blot results. Clinical data and follow-up data of included patients were statistically analyzed by R4.0.5 software. **Results** Immunohistochemical results suggested that eIF2B1 was more strongly expressed in HCC than in para-cancerous tissues. Western blot results showed that eIF2B1 was more strongly expressed in HepG2. 2.15 cells than in HepG2 cells. The expression of eIF2B1 in HCC tissues was correlated with tumor number ( $P < 0.05$ ). Cox multivariate regression analysis showed that the expression of eIF2B1 was an independent risk factor for the overall clinical prognosis of HBV-DNA positive patients ( $HR = 4.28, P = 0.018$ ). **Conclusion** The expression of eIF2B1 is significantly enhanced in HBV-associated HCC tissues and is significantly associated with overall survival in HBV DNA positive patients.

**Key words** hepatocellular carcinoma; HBV; eIF2B1; eIF2 $\alpha$ ; protein translation; prognosis