

真核细胞翻译起始复合物 4F 对 HCC 患者的预后价值

钱仁哲, 周大臣, 陆子恒, 贺良, 潘树波, 张彬

摘要 目的 研究真核细胞翻译起始复合物 4F(EIF4F) 与肝细胞肝癌(HCC) 患者临床预后的相关性。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 94 位具有随访信息的 HCC 组织标本, 并收集临床资料。将其配对的组织标本制作成组织芯片, 进行免疫组化染色。使用 Image J 分析组织芯片染色的吸光度值, 通过 R4.0.5 软件对实验数据和随访数据进行非参数检验分析、绘制 KM 生存曲线、Cox 回归分析、Nomogram 统计分析。结果 4EBP1 的磷酸化在 HCC 肿瘤组织中更多的是处于激活状态($P < 0.001$) 4EBP1 磷酸化的激活与 HCC 患者的临床预后相关($P=0.038$)。结论 肿瘤组织中的 4EBP1 的磷酸化的激活预示着 HCC 患者更短的总体生存时间。

关键词 EIF4F 复合物; 肝细胞肝癌; 疾病预后; 蛋白质翻译; Nomogram 模型

中图分类号 R 575

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1712-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.006

原发性肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 居全球恶性肿瘤病死率的第二位, 而其中以肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 最为常见^[1]。目前, 手术切除是 HCC 最有效的治疗手段, 射频消融、动脉栓塞化疗、放疗及索拉非尼等靶向药物治疗也均可改善患者预后^[2], 但是 HCC 患者的预后仍难以令人满意。因此, 寻找有效的起到预后监测作用的分子标志物有着重要意义。

真核细胞翻译起始复合物 4F(eukaryotic cell translation initiation complex 4F, EIF4F) 调控基因包含了 4EBP1、EIF4E、EIF4G 等^[3-4]。细胞生长过程依赖于一个复杂的大分子合成协调程序, 该程序可以适应环境的约束。在真核生物中, 哺乳动物雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR) 信

号通路是这一过程的主要调控因子, 部分通过控制 EIF4F 起始复合物来调节真核细胞 mRNA 的翻译。本课题组前期研究显示, 在 HCC 细胞系中突变 4EBP1 的 T37/46 磷酸化位点, HCC 细胞的增殖被显著抑制, 并推测其可能与 HCC 患者的临床预后相关。该研究评估 EIF4F 复合物与 HCC 患者预后临床之间的相关性, 以期预测 HCC 患者预后生存期。

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 4EBP1、Phop (T37/46)-4EBP1、EIF4E, Phop (Ser209)-EIF4E、EIF4G 购自美国 CST 公司; 山羊抗兔或抗鼠二抗购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 临床数据的收集与分析 从标本库中筛选出符合纳入条件的 HCC 患者组织, 筛选时间为 2000—2014 年, 制作组织芯片(tissue microarray, TMA)。其纳入标准为: ①病理明确诊断的 HCC 患者; ②首次行手术治疗的患者。排除标准为: ①肿瘤复发患者; ②术前有使用化疗及靶向药物的患者; ③同时发生了其他部位癌变的肿瘤患者; ④临床病理资料不完整的肿瘤患者。TMA 组织芯片记录了患者入院以来的肝功能指标、术后病理报道的肿瘤的大小及卫星灶、出院之后的 3 年生存率和 5 年生存率及生存状态等。该研究已通过安徽医科大学附属医院伦理委员会审查(编号: 20200863)。

1.2.2 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE) 染色 依次将石蜡切片放入二甲苯 I 10 min、二甲苯 II 10 min、二甲苯 III 10 min、无水乙醇 I 5 min、无水乙醇 II 5 min、90% 乙醇 5 min、80% 乙醇 5 min、70% 乙醇 5 min、50% 乙醇 5 min 梯度脱蜡。将石蜡切片放入苏木精染液 0.5~1 min, 自来水漂洗, 1% 盐酸乙醇分化数秒, 自来水漂洗, 然后 1% 氨水水溶液返蓝 1 min, 流动水冲洗数秒, 放入伊红染液中染色数秒, 流动水漂洗。石蜡切片依次放入 75% 乙醇 2 min, 85% 乙醇 2 min, 无水乙醇 I 5 min, 无水乙醇 II 5 min, 二甲苯 5 min 透明, 将切片从二甲苯中取出, 中性树脂封片。

2022-05-27 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2021A0325); 安徽医科大学校科研基金(编号: 2021xkj034)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院普外科, 合肥 230601

作者简介: 钱仁哲, 男, 硕士研究生;

张彬, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: zhangbin@ahmu.edu.cn

1.2.3 免疫组织化学染色(immunohistochemistry, IHC) 将组织芯片在 60℃ 烘箱中烤片、脱蜡,然后依次将烤好的切片放入二甲苯 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;将芯片放入装有枸橼酸钠缓冲液的染色槽内,放入高压锅内,装水,盖上盖子,待上汽上到最大时开始计时 20 min,关火放气,取出染色槽,流动水冲洗 10 min;将组织芯片浸入 30% 过氧化氢与甲醇 1:9 体积混合的混合液中 10 min,以过氧化氢酶封闭,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,苏木精复染 5 s,最后将切片放入 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。使用 Image J 软件分析吸光度值。

1.2.4 随访 通过与患者或者患者亲属的联系来保持对术后出院患者病情的追踪,可以有效记录术后患者的恢复情况及生存状况。对本标本库中共 743 位 iHCC 患者的临床数据进行随访,具有随访信息的为 94 位。对于术后出院患者最长的随访时间为 14 年,中位随访时间为 48 个月。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 25 软件对患者的临床特征与目标基因的表达水平进行非参数检验(Kruskal-Wallis, K-W)分析。使用 R4.0.5 软件对临床数据和吸光度值进行统计分析,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 KM(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。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳入患者的临床特征 在 94 例 HCC 患者的肝癌临床信息中,将 Phop(T37/46)-4EBP1 与患者的临床特征进行统计分析,方差齐性检验提示数据不符合正态分布,因此行非参数检验。因 2012 年之前未行病理学微血管侵犯检测,因此相关数据未纳入本研究统计分析。见表 1。

2.2 EIF4F 复合物的调控基因免疫组化染色及其

吸光度值 在 94 例 HCC 患者的免疫组化染色结果中,EIF4F 复合物的调控基因在肿瘤组织中的表达高于其在癌旁组织中的表达($P < 0.05$);4EBP1、Phop(T37/46)-4EBP1、EIF4E、Phop(Ser209)-EIF4E、EIF4G 的柱状图提示肿瘤组织中的吸光度值高于其癌旁组织中的($P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。见图 1。

2.3 EIF4F 复合物调控基因的蛋白表达量之间的相关性分析 在 94 例 HCC 患者的肝癌组织中,对 EIF4E、EIF4G、Phop(T37/46)-4EBP1 的蛋白表达量进行表达的相关性分析,EIF4E 与 EIF4G 的表达量显著相关,相关系数为 0.51;Phop(T37/46)-4EBP1 与 EIF4E、EIF4G 的相关系数分别为 0.22、0.13。见图 2。

2.4 Phop(T37/46)-4EBP1 与患者生存率的相关性 在 94 例 HCC 患者的肝癌组织中,Phop(T37/46)-4EBP1 表达的生存曲线,Phop(T37/46)-4EBP1 高表达组较非高表达组的患者预后生存时间短,差异有统计学意义($P = 0.038$)。见图 3。

2.5 Phop(T37/46)-4EBP1 的表达与 HCC 患者临床特征的关系 将 94 例 HCC 患者的指标纳入多因素回归分析,分析 Phop(T37/46)-4EBP1、EIF4E、EIF4G 是否过表达,肿瘤数目、肿瘤大小、肿瘤的分化程度、患者的甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)水平高低对患者预后生存期的影响,在此基础上做出 Cox 风险比例模型,在以上各种因素与 HCC 患者预后生存期之间的关系中,肿瘤数目与患者预后之间的相关性最显著($P = 0.035$)。见图 4。

2.6 列阵图模型预测 HCC 患者预后生存时间情况 以 Cox 风险比例模型为基础,对各个危险因素的风险比例分别给予评分,以各患者最终得分总和来预测 3 年生存率和 5 年生存率,可以看到 Phop(T37/46)-4EBP1 与 EIF4E 的评分是相对较高的,提示其对于 HCC 患者预后生存时间有着更大的意义。见图 5。

3 讨论

4EBP1 的磷酸化状态与 HCC 患者的术后总体生存时间负相关,HCC 组织中的 4EBP1 磷酸化水平增高,与患者预后生存时间显著负相关(图 3)。EIF4E 与 EIF4G 的表达是线性相关的;Phop(T37/46)-4EBP1 与患者预后 3 年存活率、5 年存活率、肿瘤直径大小、AFP 值呈线性相关,可以作为临床重要的评估或参考指标。

表1 4EBP1(T37/46)的激活状态与HCC患者临床特征关系分析($\bar{x} \pm s$)

项目	Phop(T37/46)-4EBP1 未激活($n=29$)	Phop(T37/46)-4EBP1 激活($n=65$)	Z/χ^2 值	P 值
性别[n(%)]			0.070	0.930
男	27(87.10)	57(87.70)		
女	4(12.90)	8(12.30)		
年龄(岁)	47.71 $\pm$ 9.78	51.96 $\pm$ 11.90	-1.360	0.170
随访时间(月)	53.22 $\pm$ 35.94	52.33 $\pm$ 35.28	-0.320	0.740
甲胎蛋白($\mu\text{g/L}$)	198.62 $\pm$ 596.39	4121.04 $\pm$ 16998.01	-0.470	0.630
血小板($\times 10^9$ 个/L)	162.58 $\pm$ 60.98	149.79 $\pm$ 76.07	-1.030	0.290
中性粒细胞(%)	19.53 $\pm$ 27.41	15.56 $\pm$ 22.96	-0.960	0.330
淋巴细胞(%)	6.66 $\pm$ 9.95	11.75 $\pm$ 33.58	-0.020	0.970
国际标准化比值	1.10 $\pm$ 0.15	1.10 $\pm$ 0.20	0	1.000
酒精性肝病[n(%)]			5.101	0.024
无	13(54.17)	45(78.95)		
有	11(45.83)	12(21.05)		
乙肝家族史[n(%)]			0.522	0.470
无	23(95.83)	52(91.22)		
有	1(4.17)	5(8.78)		
肝癌家族史[n(%)]			0.001	0.978
无	21(87.50)	50(87.72)		
有	3(12.50)	7(12.28)		
乙肝表面抗原[n(%)]			0.462	0.496
无	2(7.69)	8(12.70)		
有	24(92.31)	55(87.30)		
乙肝病毒脱氧核糖核酸[n(%)]			0.025	0.875
无	9(42.86)	22(44.90)		
有	12(57.14)	27(55.10)		
抗乙肝病毒抗体[n(%)]			0.852	0.356
无	19(79.17)	48(87.27)		
有	5(20.83)	7(12.73)		
卫星病灶[n(%)]			0.430	0.512
无	20(83.33)	43(76.79)		
有	4(16.67)	13(23.21)		
肝硬化[n(%)]			0.762	0.383
否	10(41.67)	17(31.48)		
是	14(58.33)	37(68.52)		
肿瘤数目(个)	1.26 $\pm$ 0.68	1.18 $\pm$ 0.51	-0.350	0.720
肿瘤大小(cm)	6.87 $\pm$ 4.20	7.41 $\pm$ 4.01	-0.650	0.510
包膜是否完整[n(%)]			0.603	0.437
否	3(15.79)	4(9.10)		
是	16(84.21)	40(90.90)		
肿瘤分期[n(%)]			1.668	0.797
I	1(4.55)	6(12.77)		
II	4(18.18)	5(10.64)		
III	12(54.54)	26(55.32)		
IV	4(18.18)	8(17.02)		
V	1(4.55)	2(4.25)		
微血管侵犯[n(%)]			1.467	0.226
否	6(54.55)	23(74.19)		
是	5(45.45)	8(25.81)		
3年生存率[n(%)]			1.100	0.300
生存	10(37.03)	16(26.22)		
死亡	17(62.93)	45(73.78)		
5年生存率[n(%)]			0.190	0.660
生存	4(14.81)	7(11.48)		
死亡	23(85.19)	54(88.52)		

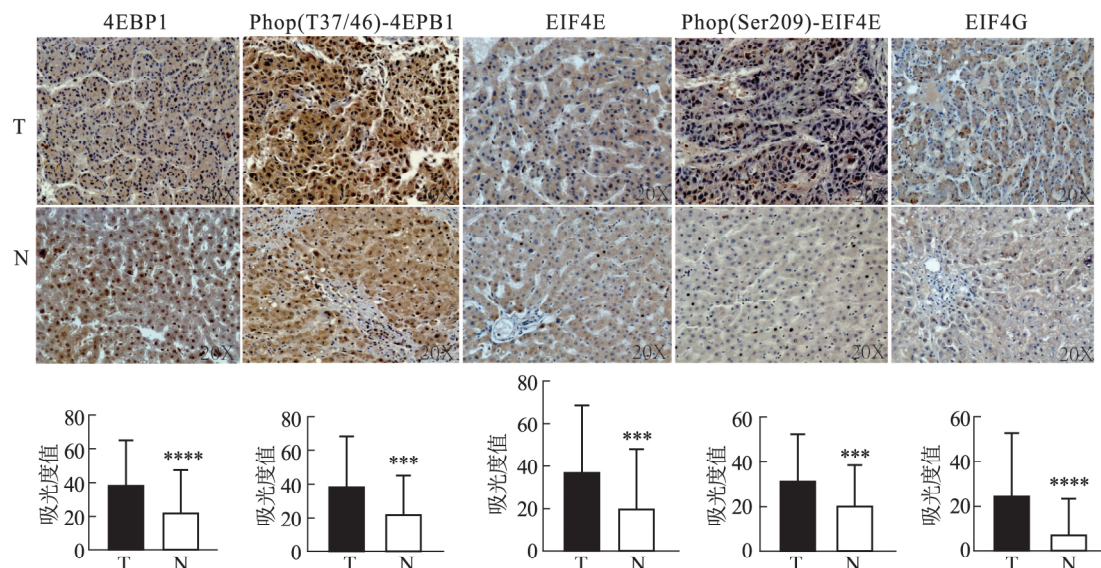


图1 肝癌组织及癌旁组织中 EIF4F 复合物调控基因的表达及吸光度值分析 IHC ×400

T: 肝癌组织; N: 癌旁组织; 与癌旁组织比较: *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

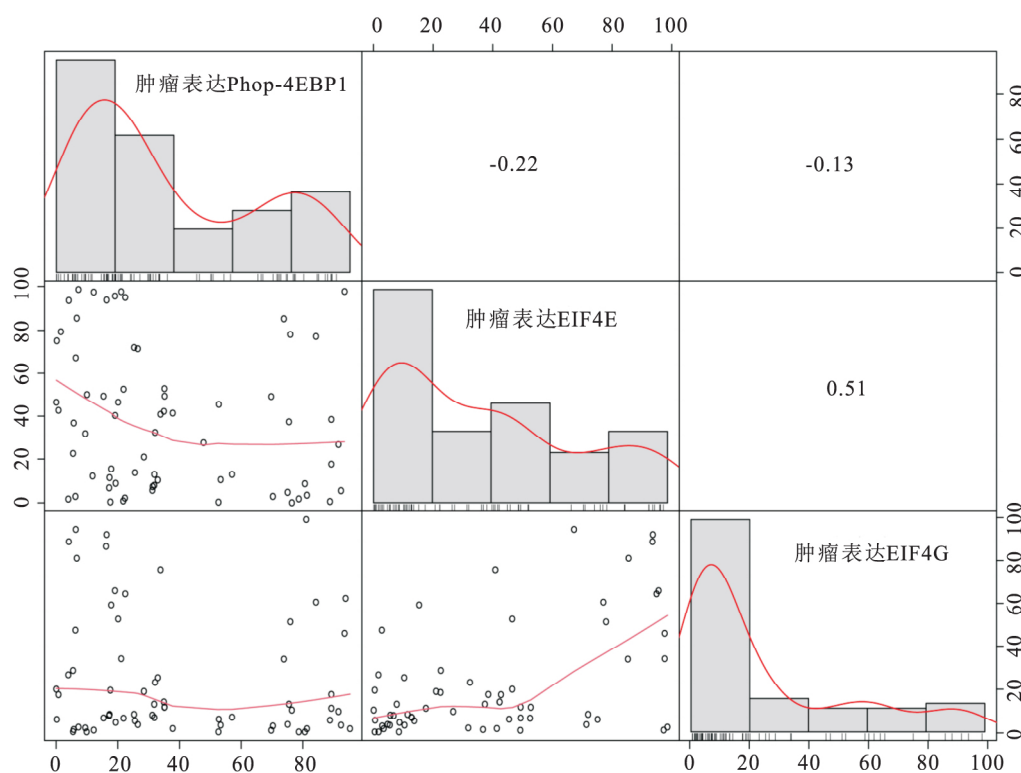


图2 EIF4F 复合物调控基因的蛋白表达量之间的相关性分析

Phop(T37/46) -4EBP1 是 4EBP1 的分子功能失活形式。4EBP1 是 mTOR 信号通路的下游中介, mTOR 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[5] 通过磷酸化 4EBP1 和 S6K 促进细胞生长和增殖,从而控制蛋白质的翻译过程。在相关性分析中

可以看到,EIF4F 复合物中的 EIF4E 和 EIF4G 之间是线性增加的,而 Phop(T37/46) -4EBP1 与其之间并没有直接的相关性;单独将 Phop(T37/46) -4EBP1 与患者预后 3 年存活率、5 年存活率、肿瘤直径大小、AFP 等值做 Cox 风险比例模型回归分析时,得出

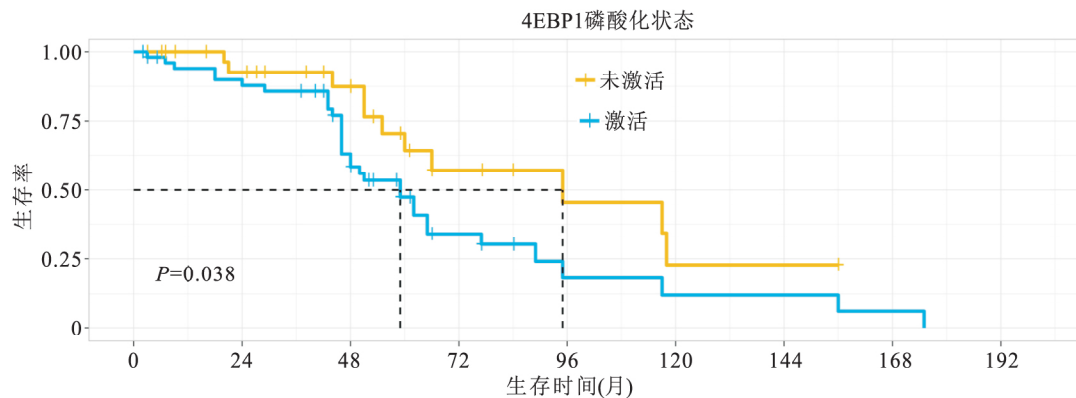


图3 HCC 患者的生存曲线分析

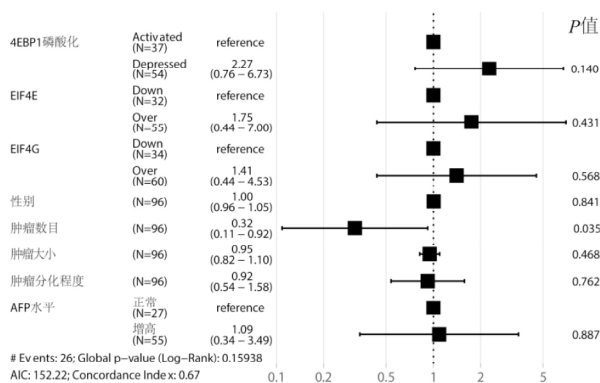


图4 HCC 患者的多因素回归分析

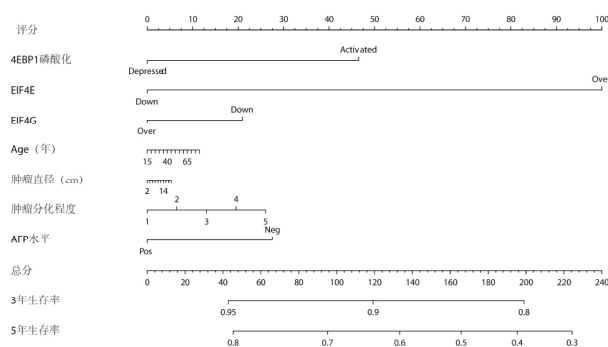


图5 HCC 纳入患者临床数据回归分析的列阵图模型

他们之间具有正相关的关系;列阵图模型分析,由患者年龄、3 年生存率、5 年生存率、肿瘤直径大小、AFP、EIF4F 复合物等值共同评分,预测预后,Phop (T37/46) 4EBP1 和 EIF4E 对于患者预后的评分所占权重较高,提示其对于 HCC 患者预后生存时间的影响可能较大。

有证据表明, mTOR 下游 4EBP1、EIF4E 水平上的蛋白合成被破坏可以促进肿瘤的形成^[6-7], Phop

(T37/46) 4EBP1 引导增殖致癌信号,是一个高度相关的恶性潜能分子标记^[8]。生长因子受体和细胞信号通路在人类癌症的发生中起着重要的作用,膜生长因子受体的激活通过至少两种主要的生物化学途径, PI3K-AKT-mTOR 和 RAS-MAPK 途径驱动细胞增殖信号^[9]。PI3K-AKT 通路通过激活 mTOR 激酶并随后磷酸化其底物 4EBP1 和 S6K 来调控翻译。MAPK 通路,参与细胞增殖、存活、凋亡和代谢,也有助于 4EBP1 的磷酸化^[10-11]。PI3K-AKT-mTOR 和 RAS-MAPK 通路都介导了 4EBP1 的磷酸化,导致了 Cap 依赖的 mRNA 翻译起始复合物的形成 Phop (T37/46) 4EBP1 抑制 4EBP1 的活性并伴随 Cap 依赖翻译的激活,可促进细胞增殖,并与肿瘤的发生发展有关^[12-13]。Phop (T37/46) 4EBP1 是 4EBP1 的灭活形式,作为肿瘤启动子,将上游的致癌信号汇聚并驱动下游的增殖信号,启动细胞周期蛋白 D1 (Cyclin-D1)、C-MYC 或血管内皮生长因子 (VEGF) 等致癌蛋白的合成。Phop (T37/46) 4EBP1 在乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌中已被证实与预后密切相关^[14],也有报道^[15]指出 Phop (T37/46) 4EBP1 与许多恶性肿瘤(包括肾细胞癌、黑色素瘤、星形细胞瘤、食道鳞状细胞癌)的侵袭性病理分级与患者的不良预后相关,这对于恶性肿瘤的发生和发展至关重要, Phop (T37/46) 4EBP1 在这些肿瘤中的表达都提示了 Phop (T37/46) 4EBP1 在肿瘤的预后中起到了至关重要的作用。

该研究也有一定的局限性。标本库中的患者失访率较高,最终纳入分析的 HCC 患者临床数据存在部分缺失。部分指标的数据非正态分布,采用非参数检验。对于 EIF4F 在 HCC 发生发展过程中的分子生物学机制,本课题组仍在进一步研究。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.
- [2] Kojiro M. Histopathology of liver cancers [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2005, 19(1): 39–62.
- [3] Gruner S, Peter D, Weber R, et al. The structures of eIF4E–eIF4G complexes reveal an extended interface to regulate translation initiation [J]. *Mol Cell*, 2016, 64(3): 467–79.
- [4] Sekiyama N, Arthanari H, Papadopoulos E, et al. Molecular mechanism of the dual activity of 4EGI-1: Dissociating eIF4G from eIF4E but stabilizing the binding of unphosphorylated 4E–BP1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(30): E4036–45.
- [5] Mossmann D, Park S, Hall M N. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(12): 744–57.
- [6] Thoreen C C. Many roads from mTOR to eIF4F [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(4): 913–6.
- [7] Pelletier J, Jeremy G, Davide R, et al. Targeting the eIF4F translation initiation complex: a critical nexus for cancer development [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(2): 250–63.
- [8] Asimomytis A, Karanikou M, Rodolakis A, et al. mTOR downstream effectors, 4EBP1 and eIF4E, are overexpressed and associated with HPV status in precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3234–40.
- [9] Golob-Schwarzl N, Stefanie K, Anna M T, et al. New liver cancer biomarkers: PI3K/AKT/mTOR pathway members and eukaryotic translation initiation factors [J]. *Eur J Cancer*, 2017, 83: 56–70.
- [10] Huang K, Fingar D C. Growing knowledge of the mTOR signaling network [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 79–90.
- [11] Magnuson B, Ekim B, Fingar D C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks [J]. *Biochem J*, 2012, 441(1): 1–21.
- [12] 谢海深, 周大臣, 李 扬, 等. 七叶皂苷钠通过 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制 eIF4F 复合物缓解大鼠肝纤维化 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(11): 1733–38.
- [13] Samarin J, Laketa V, Malz M, et al. PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of oncogenic far-upstream element binding proteins in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2016, 63(3): 813–26.
- [14] Alabdullah M L, Ahmad D A, Moseley P, et al. The mTOR downstream regulator (p-4EBP1) is a novel independent prognostic marker in ovarian cancer [J]. *J Obstet Gynaecol*, 2019, 39(4): 522–8.
- [15] Qu Y Y, Zhao R, Wang H K, et al. Phosphorylated 4EBP1 is associated with tumor progression and poor prognosis in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23594.

The prognostic value of eukaryotic cell translation initiation complex 4F in HCC patients

Qian Renzhe, Zhou Dachen, Lu Ziheng, He Liang, Pan Shubo, Zhang Bin

(Dept of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To study the correlation between eukaryotic translation initiation complex 4f (EIF4F) and clinical prognosis of patients with hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** By following up the clinical data of 743 HCC patients in the specimen bank, 94 HCC tissue specimens with complete follow-up information were selected, and the clinical data were collected. The paired tissue specimens were made into tissue chip for immunohistochemical staining. Image J was used to analyze the optical density value of tissue chip staining, and R4.0.5 software was used to conduct nonparametric test analysis, draw KM curve, Cox regression analysis, and Nomogram statistical analysis on experimental data and follow-up data. **Results** Phosphorylation of 4EBP1 was significantly activated in HCC tissues ($P < 0.001$), and the activation Phosphorylation of 4EBP1 was associated with the clinical prognosis of HCC patients, $P = 0.038$. **Conclusion** The activation of 4EBP1 phosphorylation in tumor tissue predicts shorter overall survival time in HCC patients.

Key words EIF4F; hepatocellular carcinoma; prognosis of disease; protein translation; Nomogram model