

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201305004

· 论著 ·

p-eIF4E 和 p-Mnk1 在头颈鳞状细胞癌中的表达及临床意义

李 姣¹, 谢贵元², 李美蓉¹, 范松青¹

(中南大学湘雅二医院 1. 病理科; 2. 肿瘤科, 湖南 长沙 410011)

摘要: **目的** 探讨磷酸化真核细胞翻译起始因子 4E (p-eukaryotic translation initiation factor 4E, p-eIF4E) 和磷酸化 MAPK 作用激酶 1 (p-MAP kinase integrating kinase, p-Mnk1) 在头颈鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell cancer, HNSCC) 中的表达及其临床意义。**方法** HNSCC 组织芯片结合免疫组化 S-P 法检测 p-eIF4E 和 p-Mnk1 在 60 例 HNSCC 和 35 例癌旁组织中的蛋白表达, 分析两者表达与 HNSCC 临床病理特征的相关性。**结果** p-eIF4E 和 p-Mnk1 在 HNSCC 中的阳性表达率显著高于癌旁组织 ($P < 0.01$), p-eIF4E 的阳性表达率与 HNSCC 的分化程度、临床分期显著相关 ($P < 0.05$); 有淋巴结转移 HNSCC 的 p-Mnk1 阳性表达率显著高于无淋巴结转移者 ($P < 0.05$)。HNSCC 组织中 p-eIF4E 和 p-Mnk1 表达呈显著正相关 ($r = 0.375, P = 0.005$)。**结论** HNSCC 组织中 p-eIF4E 和 p-Mnk1 异常表达与 HNSCC 的临床进展和浸润转移相关, 两者在肿瘤发生发展过程中有协同作用。

关键词: p-真核细胞翻译起始因子 4E; p-MAPK 作用激酶 1; 头颈鳞状细胞癌; 癌旁组织
中图分类号: R34; R739.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2013)05-0399-04

Clinical significance of the expression of p-eIF4E and p-Mnk1 in HNSCC

LI Jiao, XIE Gui-yuan, LI Mei-rong, et al.

(Department of Pathology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of p-eIF4E and p-Mnk1 in the head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and its clinical significance. **Methods** Expression of p-eIF4E and p-Mnk1 was detected in 60 samples of HNSCC and 35 of peri-cancer tissues by tissue microarray immunohistochemical S-P method. **Results** The positive expression rates of p-eIF4E and p-Mnk1 in HNSCC were significantly higher than those of peri-cancer tissues (both $P < 0.01$). The expression of p-eIF4E was correlated with pathological grading and clinical stages of HNSCC ($P < 0.05$). The expression rate of p-Mnk1 in HNSCC with lymphatic metastasis was significantly higher than that without metastasis ($P < 0.05$). In addition, the expression of p-eIF4E was positively correlated with that of p-Mnk1 in HNSCC ($r = 0.361, P = 0.005$). **Conclusions** The abnormal expression of p-eIF4E and p-Mnk1 is related to the development, invasion and metastasis of HNSCC. Co-expression of p-eIF4E and p-Mnk1 has a possible synergistic action that may promote the carcinogenic process of HNSCC.

Key words: p-eIF4E; p-Mnk1; Head and neck squamous cell carcinoma; Peri-cancer tissue

磷酸化真核细胞翻译起始因子 4E (p-eukaryotic translation initiation factor 4E, p-eIF4E) 作为帽依赖性 mRNA 翻译过程中的限速因子,

eIF4E 的激活是 AKT/mTOR 信号通路磷酸化激活的一个关键下游事件。尤为重要的是 p-eIF4E 的激活能上调各种肿瘤相关蛋白表达, 促进肿瘤的发生与发展。MAPK 作用激酶 1 (p-MAP kinase integrating kinase, p-Mnk1) 作为催化 eIF4E 磷酸化的唯一激酶, p-Mnk1 通过 Mnk1-eIF4G 相互作用方式致 eIF4E Ser209 位

基金项目: 国家自然科学基金资助(81071820)
作者简介: 李 姣, 女, 硕士研究生。
通讯作者: 范松青, Email: fansongqing2000@yahoo.com.cn

点磷酸化。p-eIF4E 增加与 mRNA 帽结构的亲和性,有利于其进入翻译起始复合体,提高 mRNA 帽依赖蛋白质的翻译效率。头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell cancer, HNSCC)存在 eIF4E 蛋白高表达,在肿瘤的发生发展中起重要作用^[1-2],eIF4E 反义 RNA 可能成为头颈部肿瘤的辅助治疗方法之一^[3-4]。我们前期研究发现 HNSCC 组织中存在 p-eIF4E 蛋白高表达^[5]。但目前未见联合检测 p-eIF4E 和 p-Mnk1 在 HNSCC 中蛋白表达的文献报道。本研究利用 HNSCC 组织芯片结合免疫组化法检测 p-eIF4E 和 p-Mnk1 在 HNSCC 组织中的蛋白表达,探讨 p-eIF4E 和 p-Mnk1 表达与 HNSCC 临床病理特征的关系及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

组织芯片 60 例 HNSCC 患者中男 44 例,女 16 例;年龄 37~75 岁,平均年龄 55.2 岁。依据 2002 年国际抗癌联盟(UICC)头颈部恶性肿瘤的临床分类:其中 T1、T2 34 例,T3、T4 26 例;高分化 HNSCC 12 例,中分化 23 例,低分化 25 例;有淋巴结转移癌 24 例,无淋巴结转移癌 36 例。

1.2 实验方法

含 99 个组织点阵的 HNSCC AccuMax TM Array 购买于韩国 ISU ABXIS Co. Ltd 公司,免疫组化染色后显微镜下观察证实含 95 个有效组织点。组织微阵列中所有组织点经 HE 染色,光镜下病理诊断证实。这些组织点阵包括 60 例 HNSCC 组织与 35 例距离癌组织 1.0 cm 的癌旁非肿瘤上皮组织。

p-Mnk1 (Thr197/202) 兔抗人多克隆抗体购买于 Cell Signaling 公司,p-eIF4E (Ps209) 兔抗人单克隆抗体购买于 Epitomics 公司。免疫组化 S-P 法(Two-StepTM Anti-Mouse or Rabbit Detection Reagent,辣根过氧化物酶 HRP 标记)检测试剂盒为 Novocastra Laboratories, Ltd 产品。p-eIF4E 和 p-Mnk1 抗体的工作浓度均为 1:500。组织芯片切片脱蜡、水化后,3% H₂O₂ 室温阻断内源性过氧化物酶 30 min,切片置于 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中,高温高压抗原修复 15 min;正常非免疫血清封闭 30 min;切片

滴加一抗 p-eIF4E 和 p-Mnk1,置密封湿盒中 4℃ 孵育过夜。二抗于室温(25℃) 30 min。DAB 显色,苏木素复染、中性树胶封片。试剂提供的阳性对照片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定

免疫组化评分标准参考文献^[5]。①根据阳性染色强度判断:细胞无染色,记 0 分;细胞呈浅棕色,弱阳性,记 1 分;细胞染成棕色,并无背景染色,或细胞呈深棕色、有浅棕色背景,为中等阳性,记 2 分;细胞呈深棕色,无背景着色,为强阳性,记 3 分。②根据阳性细胞表达数计分:无阳性细胞表达,计 0 分;阳性表达细胞 ≤25%,计 1 分;25% < 阳性细胞数 ≤50%,计 2 分;阳性表达细胞数 50% 以上,为强阳性,计 3 分。最终计分结果为两位病理学专家分别按上述一种判断标准得分乘积。本实验中用于分析的结果为:0,1 分评定为无表达;2,3,4,6,9 分视为阳性表达。

1.4 统计学方法

SPSS 16.0 统计软件对 p-eIF4E 和 p-Mnk1 表达与 HNSCC 的临床病理特征进行 χ^2 检验,p-eIF4E 和 p-Mnk1 在 HNSCC 组织中表达进行 Spearman's 相关分析检测,以双侧检验水准 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 p-eIF4E 和 p-Mnk1 表达与 HNSCC 临床病理特征的关系

p-Mnk1 蛋白阳性表达于 HNSCC 癌细胞核(图 1);p-eIF4E 蛋白阳性信号主要位于癌细胞浆,散在少数癌组织为细胞浆和细胞核共同阳性染色(图 2)。

HNSCC 组织中 p-eIF4E 的阳性表达率为 75% (45/60),高于癌旁组织 (42.9%, 15/35; $\chi^2 = 9.815, P < 0.01$),HNSCC 组织中 p-Mnk1 的阳性表达率为 80.2% (47/60),高于癌旁组织 (48.6%, 17/35; $\chi^2 = 8.907, P < 0.01$)。高分化、中分化鳞状细胞癌的 p-eIF4E 阳性表达患者显著高于低分化鳞状细胞癌 p-eIF4E 阳性表达患者 ($P < 0.05$); T1、T2 HNSCC 中的阳性表达率显著高于 T3、T4 ($P < 0.05$);但 p-eIF4E 阳性表达率与 HNSCC 淋巴

结转移无显著相关性 ($P > 0.05$)。有淋巴结转移 HNSCC 组织中 p-Mnk1 阳性表达率显著高于无淋巴结转移者 ($P < 0.05$); 但 p-Mnk1

阳性表达率与 HNSCC 的分化程度和临床分期无显著相关性 ($P > 0.05$)。见表 1。

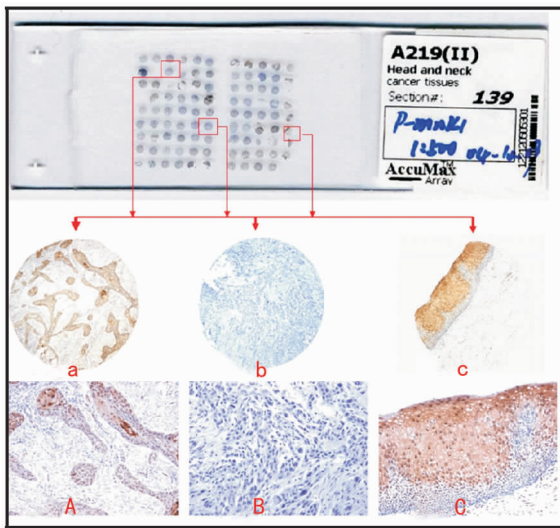


图 1 p-Mnk1 在 HNSCC 组织中的表达 A: 癌组织 p-Mnk1 表达阳性, B: 癌组织 p-Mnk1 表达阴性, C: 癌旁组织 p-Mnk1 表达阳性。a, b, c (DAB $\times 40$); A, B, C (DAB $\times 100$)

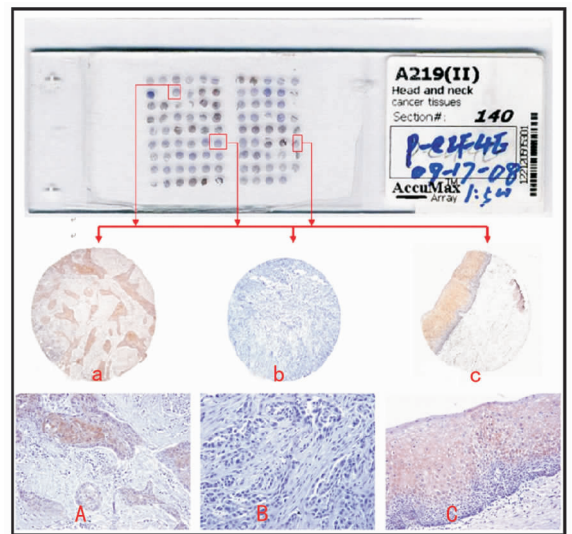


图 2 p-eIF4E 在 HNSCC 组织中的表达 A: 癌组织 p-eIF4E 表达阳性, B: 癌组织 p-eIF4E 表达阴性, C: 癌旁组织 p-eIF4E 表达阳性。a, b, c (DAB $\times 40$); A, B, C (DAB $\times 100$)

表 1 p-eIF4E 和 p-Mnk1 表达与 HNSCC 临床病理特征的关系 (例)

分组	例数	P-eIF4E		χ^2	P	P-Mnk1		χ^2	P
		阳性	阴性			阳性	阴性		
性别									
男	44	35	9	1.818	0.178	36	8	1.181	0.277
女	16	10	6			11	5		
年龄									
<50	23	17	6	0.024	0.817	19	4	0.402	0.526
≥ 50	37	28	9			28	9		
病理分级									
高分化	12	10	2	5.143	0.023 *	11	1	2.696	0.101
中分化	23	20	3			19	4		
低分化	25	15	10			17	8		
T 分级									
T1、T2	34	29	5	4.434	0.035	25	9	1.067	0.302
T3、T4	26	16	10			22	4		
淋巴结转移									
有	24	19	5	0.370	0.543	22	2	5.926	0.015
无	36	26	10			23	13		

注: * 高分化和中分化癌与低分化癌比较 $P < 0.05$

2.2 p-eIF4E 和 p-Mnk1 在 HNSCC 组织中的相关性分析

在 HNSCC 组织中 p-eIF4E 和 p-Mnk1 中共同阳性率为 41/60 (68.3%), 采用 Spearman 相关分析显示两者共同阳性表达率呈正相关 ($r = 0.375, P = 0.005$), 结果见表 2。

表 2 HNSCC 中 p-eIF4E 和 p-Mnk1 蛋白表达的相关性分析 (例)

P-Mnk1	p-eIF4E	
	阳性	阴性
阳性	41	6
阴性	4	9

3 讨论

eIF4E 作为 PI3K/AKT/mTOR 和 Ras/Raf/MAPK 两条信号转导通路的中心汇集点, p-Mnk1 通过 Mnk1-eIF4G 相互作用方式致 eIF4E Ser209 位点磷酸化。p-eIF4E 增加与 mRNA 帽结构的亲和性, 有利于其进入翻译起始复合体, 提高 mRNA 帽依赖蛋白质的翻译效率^[6-8]。eIF4E 可激活上调多种肿瘤相关蛋白的表达, 抑制细胞凋亡, 在促进肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用。HNSCC 中普遍存在 eIF4E 表达升高的现象^[2]。本研究结果显示 HNSCC 组织中存在 p-eIF4E 和 p-Mnk1 蛋白高表达, 并且其表达显著高于癌旁组织, 提示高水平的 p-eIF4E 和 p-Mnk1 在 HNSCC 肿瘤发生、发展中具有重要作用。本研究进一步发现 p-eIF4E 的表达与 HNSCC 的分化程度有关, 这一结果与 Fan 等^[5] 研究结果相一致, 提示 p-eIF4E 可能是在 HNSCC 发生发展的早期阶段发挥重要生物学作用, p-eIF4E 可作为 HNSCC 恶性程度和临床进展评估的有用标志。尽管 p-Mnk1 的表达与 HNSCC 的分化程度无关, 但淋巴结转移 HNSCC 的 p-Mnk1 阳性显著高于无淋巴结转移者, 推测 p-Mnk1 蛋白表达可能在 HNSCC 的较晚期阶段发挥, p-Mnk1 阳性表达促进 HNSCC 的浸润转移发生。

本研究结果不但显示 HNSCC 组织中存在 p-eIF4E 和 p-Mnk1 蛋白的异常高表达, 而且 p-eIF4E 和 p-Mnk1 蛋白的表达呈正相关, 这一结果与 Wang 等^[9] 研究发现 mTOR 抑制剂通过 Mnk 依赖机制增加 eIF4E 磷酸化这一结果一致。提示 p-eIF4E 和 p-Mnk1 在蛋白质的翻译起始前及翻译过程中可能起着重要的协同作用, p-eIF4E 和 p-Mnk1 在 HNSCC 中的如何协同作用的机制有待我们进一步研究。p-eIF4E 的激活需要磷酸化 Mnk 参与, p-eIF4E 和 p-Mnk1 共同促进或相继导致了 HNSCC 的发生、恶化转化和侵袭转移。Mnk 的失活可消除 Rapamycin 诱导 eIF4E 磷酸化的效应, 特异性地靶向抑制 eIF4E 磷酸化可诱导肿瘤细胞凋亡、抑制细胞增殖并且抑制肿瘤的侵袭和转移。因此, 基于 mTOR 反馈机制的靶向抑制 Mnk1/eIF4E 通路可作为肿瘤患者的潜在治疗靶标,

联合靶向抑制 p-Mnk1 和 p-eIF4E 可能成为 HNSCC 治疗的新策略^[10]。由此可见, p-eIF4E 蛋白表达与其他某些基因^[11] 一样可作为判断 HNSCC 恶性程度的分子标志, p-Mnk1 可能作为评估 HNSCC 有无淋巴结转移的分子标志。抑制 p-eIF4E 和 p-Mnk1 的表达, 可能为 HNSCC 的靶向治疗提供一条新途径。

参考文献:

- [1] 黄东海, 田勇泉, 肖健云, 等. 组织微阵列研究 eIF4E 在鼻咽癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2005, 11(1): 1-4.
- [2] Sunavala-Dossabhoy G, Palaniyandi S, Clark C, et al. Analysis of eIF4E and 4EBP1 mRNAs in head and neck cancer [J]. Laryngoscope, 2011, 121(10): 2136-2141.
- [3] Defatta RJ, Nathan CO, De Benedetti A. Antisense RNA to eIF4E suppresses oncogenic properties of a head and neck squamous cell carcinoma cell line [J]. Laryngoscope, 2000, 110(6): 928-933.
- [4] 滕博, 金春顺, 文连姬, 等. 喉癌 eIF4E 基因的体外转录 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2008, 14(4): 251-254.
- [5] Fan S, Ramalingam SS, Kauh J, et al. Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(15): 1463-1469.
- [6] Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, et al. Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(15): 6539-6549.
- [7] Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, et al. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA [J]. J Biol Chem, 2002, 277(5): 3303-3309.
- [8] Silva RL, Wendel HG. MNK, EIF4E and targeting translation for therapy [J]. Cell Cycle, 2008, 7(5): 553-555.
- [9] Wang X, Yue P, Chan CB, et al. Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Induces Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent and Mnk-Mediated Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Phosphorylation [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(21): 7405-7413.
- [10] Wheeler MJ, Johnson PW, Blaydes JP. The role of MNK proteins and eIF4E phosphorylation in breast cancer cell proliferation and survival [J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(7): 728-735.
- [11] 刘勇, 张欣, 田勇泉. EphA2 基因与头颈鳞癌 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2010, 16(6): 474-478.

(修回日期: 2013-05-02)