

真核细胞翻译起始因子 4E 对鼻咽癌侵袭转移的作用^{*}

李 哲¹, 翁玉玲², 刘艳明¹ (1. 广东省东莞市大朗医院 523770; 2. 广东省东莞市人民医院 523000)

【摘要】 目的 分析真核细胞翻译起始因子 4E(eIF4E)对鼻咽癌侵袭转移的促进作用,为临床评估鼻咽癌侵袭转移提供新的筛查靶点。**方法** 利用细胞试验研究 eIF4E 在鼻咽癌细胞中高表达的机制,和被人潜伏膜蛋白(LMP1)诱导转录活化的机制,以及转录活化对鼻咽癌细胞侵袭转移的影响。**结果** eIF4E 可以被 LMP1 诱导转录活化,vector 组 eIF4E 的 mRNA 表达水平与 MOCK 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。LMP1 组与 vector 组比较,eIF4E 的 mRNA 表达水平显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。经灰度分析,MOCK 组与 vector 组 eIF4E 的 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),LMP1 组为 vector 组的 2.173 倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** eIF4E 经 LMP1 诱导转录活化后,可促进鼻咽癌的侵袭转移,提示 LMP1 是致癌效应信号传递的一个关键节点,可以作为临床评估鼻咽癌侵袭转移的一个新的筛查靶点。

【关键词】 真核细胞翻译起始因子; 鼻咽癌; 侵袭转移
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.14.031 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)14-1960-02

在我国,鼻咽癌的发病率较高,是一种较为常见的恶性肿瘤^[1],尤其在我国的广东和湖南等地区,发病率极高。鼻咽癌还具有极易侵袭转移的特点,有较高的病死率。因此,临床积极研究鼻咽癌的侵袭转移机制具有较强的现实意义^[2]。大量的研究发现,在鼻咽癌中真核细胞翻译起始因子 4E(eIF4E)和 EB 病毒(EBV)的人潜伏膜蛋白(LMP1)之间具有较强的相关性^[3]。因此,本研究中,作者即利用细胞试验分析 eIF4E 对鼻咽癌侵袭转移的促进作用,为临床评估鼻咽癌侵袭转移提供新的筛查靶点,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)细胞株。将高分化鼻咽癌细胞株(CNE1)和低分化鼻咽癌细胞株(CNE2)作为研究对象,B95-8 细胞作为对照。其中 CNE1、EBV 呈阴性,CNE2 初建时 EBV 呈阳性,以及 EBV 感染的永生化绒猴外周血淋巴细胞株 B95-8 细胞,EBV 呈阳性,且 LMP1 呈强阳性表达。(2)主要试剂与仪器。BeyoECL Plus、光学显微镜与梯度聚合酶链反应(PCR)扩增仪 Mastercycler 等。

1.2 分组 取对数期 CNE1 细胞进行接种,24 h 后转染 CNE1 细胞,标记为 LMP1 组和 vector 组,并设置未转染 MOCK 组。

1.3 方法 (1)转染。细胞培养后,取对数期的细胞进行接种和培养。进行双荧光素酶试验,用 24 孔板进行转染,CCK-8 增殖试验则选用 96 孔板进行转染,实时荧光定量(Real-time)PCR 和 Western blot 利用 6 孔板转染。(2)提取 RNA。采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,并利用核酸蛋白测量仪检测样品的纯度和浓度。(3)逆转录 PCR 检测。逆转录反应合成 cDNA,并进行 Real-time PCR。(4)Western blot 试验。对蛋白条带的灰度进行测定,并将目标条带灰度值与对应的内参灰度值进行比较,比值作为分析指标。(5)提取 DNA。使用 MicroE-lute Genomic DNA 提取试剂盒进行提取。(6)筛选。制备 LMP1 基因 RNA 干扰质粒,并筛选出有效靶点。(7)电泳。进行核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳试验,并进行银染鉴定。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计软件对研究所得数据进行统一录入和分析,计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转录关系分析 见表 1。由表 1 可见,eIF4E 被 LMP1 诱导转录活化。vector 组 eIF4E 的 mRNA 表达水平与 MOCK 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。LMP1 组与 vector 组比较,eIF4E 的 mRNA 水平显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 瞬时转染 LMP1 对 CNE1 细胞 eIF4E 的 mRNA 表达水平的影响

组别	eIF4E/GAPDH	LMP1/GAPDH
MOCK 组	1.0	0
vector 组	0.8	0
LMP1 组	1.5	1 500

注:GAPDH 为磷酸甘油醛脱氢酶。

2.2 电泳灰度比较 经灰度分析显示,MOCK 组与 vector 组 eIF4E 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。vector 组与 LMP1 组 eIF4E,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 LMP1 转染后 CNE1 细胞 eIF4E PCR 产物 PAGE 电泳灰度比较

组别	$\bar{x}$	s
MOCK 组	0.642	0.092
vector 组	0.762	0.082
LMP1 组	1.569	0.114

注:PAGE 为聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2.3 eIF4E 与鼻咽癌侵袭转移关系分析 LMP1 转染 CNE1 细胞,细胞侵袭转移活性显著高于 B95-8 细胞组,差异有统计

^{*} 基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(WSTJJ20121112340104197805173015)。

学意义($P<0.05$)。对 eIF4E 转录表达进行稳定干扰,会抑制 CNE 细胞增殖,DNA 合成期(S)细胞比例下降,侵袭转移活性显著低于 CNE2 细胞,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

大量的研究结果表明,在很多恶性肿瘤中都会出现 eIF4E 表达水平较高的情况。因此,肿瘤细胞系中 eIF4E 的高表达极有可能导致肿瘤发生侵袭转移^[4]。鼻咽癌具有极易侵袭转移的特点,导致了较高的病死率。因此,本研究通过细胞试验研究 eIF4E 与鼻咽癌侵袭转移机制之间的关系。

eIF4E 会对蛋白质合成的起始阶段产生重要影响,发挥重要的调控作用^[5-6]。以往的研究发现,在鼻咽癌转移复发组织中 eIF4E 出现了高表达现象。本研究利用细胞试验构建出含有 eIF4E 启动子的各种重组质粒,并利用实时定量基因扩增 PCR,对鼻咽癌细胞及 B95-8 细胞中 eIF4E、LMP1 等的实际表达水平进行了检测。然后通过 Western blot 试验对 LMP1 转染对 eIF4E 蛋白表达水平的影响进行检测。最终研究结果显示,eIF4E 被 LMP1 诱导转录活化,vector 组 eIF4E 的 mRNA 表达水平与 MOCK 组之间差异不明显;LMP1 组与 vector 组比较,eIF4E 的 mRNA 水平显著上升。由此说明在鼻咽癌细胞中 LMP1 会对 eIF4E 进行诱导转录。分析原因可能与 eIF4E 的高表达有关。在经 LMP1 诱导转录之后,eIF4E 的蛋白水平会显著上升,说明在鼻咽癌发生和发展过程中,eIF4E 的转录活化会发挥较大的作用。且 eIF4E 被 LMP1 诱导转录程度在低分化鼻咽癌细胞较为明显,说明 eIF4E 的转录活化会参与到 EBV 的致癌过程中。而在 B95-8 细胞中 LMP1 也会对 eIF4E 进行诱导转录,说明 LMP1 诱导转录 eIF4E 的情况可能普遍存在于各 EBV 相关肿瘤中^[7-8]。在转化机制方面分析可知,可能是因为 LMP1 在诱导 c-myc 表达之后,c-myc 会与 eIF4E 启动子结合起来,对 eIF4E 的转录活化予以有效激活。且有研究发现,转录表达 eIF4E 可以提高 LMP1 mRNA 的实际水平^[9-10]。说明 eIF4E 会对 LMP1 的转录进行诱导,但具体机制还需要进一步深入研究。研究结果还显示,LMP1 转染 CNE1 细胞,细胞侵袭转移活性显著高于 B95-8 细胞组。即说明在经过 LMP1 的诱导转录活化之后,eIF4E 会促进鼻咽癌细胞的增殖和运动,显著提高其侵袭转移能力,且在低分化鼻咽癌细胞中尤为明显。因此,eIF4E 可以作为今后研究鼻咽癌侵袭转移的重要靶点^[11]。

综上所述,eIF4E 经 LMP1 诱导转录活化后,促进了鼻咽癌的侵袭转移,提示其可能是 LMP1 致癌效应信号传递的一个关键节点,可以作为临床评估鼻咽癌侵袭转移的一个新的筛查靶点。在今后的研究中,可以对其进行更深入的研究。

(上接第 1959 页)

workers[J]. Infect Control Hosp Epidemiol,2010,31(7): 716-721.

[7] Munoz-Price LS, Weinstein RA. Acinetobacter infection [J]. N Engl J Med,2008,358(12):1271-1281.

[8] 刘丁,陈萍,陈伟,等. 鲍曼不动杆菌医院感染的危险因素及基因分型研究[J]. 中华流行病学杂志,2003,24(2):

参考文献

[1] 陈俊,唐安洲,梁钢,等. 苦参碱改构体 X 调控 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 蛋白表达诱导人鼻咽癌 CNE1 凋亡的研究[J]. 中国药理学通报,2013,11(8):1138-1140.

[2] 谢林英,胡志燕,王晓燕,等. 长非编码 MALAT1 基因在人鼻咽癌细胞株的表达及生物学意义[J]. 南方医科大学学报,2013,33(5):692-697.

[3] 叶奕菁,陆小军,储兵,等. 鼻咽癌组织碱性成纤维细胞生长因子表达及其与浸润转移关系的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2010,17(19):1541-1543.

[4] Graff JR, Zimmer SG. Translational control and metastatic progression:enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF4E selectively enhances translation of metastasis related mRNAs[J]. Clin Exp Metastasis,2003,20(3): 265-273.

[5] 单中杰,陈奎生,侯笏岚,等. 真核始动因子 4E 反义寡核苷酸对人膀胱癌 BIU-87 细胞中 eIF4E 和肝素酶表达的影响[J]. 中华泌尿外科杂志,2011,32(12):827-831.

[6] 周平,徐启革. 结直肠癌组织真核细胞起始因子 4E 和基质金属蛋白酶-9 的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学,2012,16(8):1423-1425.

[7] 潘国庆,付红梅,金树珍,等. 真核细胞翻译起始因子 4E 蛋白在子宫内膜癌中的表达及意义[J]. 广东医学,2012, 15(12):12-13.

[8] 金娜,胡凯,朱庆尧,等. 上皮钙黏蛋白启动子-160 C/A 位点单核苷酸多态性与鼻咽癌的相关性[J]. 中国癌症杂志,2013,23(7):512-518.

[9] 孙艳芹,徐秋燕,赵颖海,等. 真核细胞翻译起始因子 4E 蛋白在鼻咽癌中的表达及其临床意义[J]. 海南医学, 2013,24(15):2185-2187.

[10] Wang Z, Luo F, Li L, et al. STAT3 activation induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein1 causes vascular endothelial growth factor expression and cellular invasiveness via JAK3 And ERK signaling[J]. Eur J Cancer,2010,46(16):2996-3006.

[11] 潘国庆,付红梅,边莉,等. PAI-1 在鼻咽癌细胞系(CNE-2Z)及其克隆株(CNE-2Z-H5,CNE-2Z-H5-9)中表达和意义[J]. 中国癌症杂志,2005,15(3):271-274.

(收稿日期:2013-12-31 修回日期:2014-02-04)

140-142.

[9] Aloush V, Navon VS, Seigman LY, et al. Multi drug-resistant Pseudomonas Aeruginosa: risk factors and clinical impact[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(8): 43-48.

(收稿日期:2014-01-22 修回日期:2014-03-10)