

宫颈上皮内瘤变与宫颈鳞癌组织的差异蛋白质组学研究

王晓丽^{1,2}, 赵群¹, 何玥¹, 陈硕³, 钱小红³, 张玉祥⁴, 吴玉梅¹

(1.首都医科大学附属北京妇产医院, 北京 100006; 2.北京大学首钢医院, 北京 100041; 3.北京蛋白质组中心, 北京 100000; 4.首都医科大学生物化学教研室, 北京 100069)

摘要: [目的] 比较宫颈上皮内瘤变(CIN)与宫颈鳞癌(SCC)组织之间蛋白质组的差异, 寻找与宫颈癌相关的特异性蛋白质, 为研究 CIN 发展为宫颈癌的分子机制及临床诊治工作提供新的线索。 [方法] 收集正常宫颈组织 9 例, CIN 组织 23 例(其中 CIN I 7 例, CIN II 8 例, CIN III 8 例)及 SCC 组织 7 例。应用二维荧光差异凝胶电泳(2-D DIGE)寻找差异表达蛋白质点, 基质辅助激光解析飞行时间串联质谱(MALDI-TOF/TOF MS)分析差异蛋白质点。进一步对 3 个重要差异蛋白 S100A9、eEF1A1 及 PKM2 应用免疫组织化学定性及 Western Blot 定量检测其在宫颈组织中的表达。 [结果] 建立了分辨率高、重复性好的 CIN 与 SCC 的双向凝胶电泳图谱。两组差异蛋白质点共 860 个, 标记蛋白质点 46 个(27 个上调, 19 个下调), 成功鉴定 25 个蛋白质。免疫组化及免疫印迹结果显示 S100A9 在 SCC 中表达水平高于 CIN, 而 PKM2、eEF1A1 在 SCC 中表达水平显著低于 CIN。 [结论] CIN 与 SCC 间存在蛋白质表达的差异, 这些差异表达的蛋白质可能成为宫颈癌早期诊断的标志物及治疗的新靶点。

关键词: 宫颈上皮内瘤变; 宫颈肿瘤; 蛋白质组学; 差异凝胶电泳; S100 钙结合蛋白 A9; 真核延长因子 1A1; 丙酮酸激酶 M2

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2012)06-0450-06

Differential Proteomics of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Squamous Cervical Carcinoma Tissue

WANG Xiao-li^{1,2}, ZHAO Qun¹, HE Yue¹, et al.

(1. Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China; 2. Shougang Hospital, Beijing University, Beijing 100041, China)

Abstract: [Purpose] To identify candidate biomarkers for cervical cancer and reveal related molecular mechanism for clinical diagnosis and treatment. [Methods] Tissue samples from patients with squamous cervical carcinoma (SCC) (7 cases), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) (23 cases) and disease-free controls (9 cases) were collected. 2-D DIGE was applied to separate proteins and the images of the gels were analyzed. Then MALDI-TOF/TOF MS was used to identify the differentially expressed proteins and further to validate 3 strikingly differential proteins S100A9, eEF1A1 and PKM2 with immunohistochemistry and western blot. [Results] A total of 46 differential proteins-spots (19 up-regulated and 27 down-regulated) were marked between CIN and SCC, of which 25 proteins were identified. Immunohistochemistry and Western Blot confirmed that the expression level of S100A9 was higher in SCC than that in CIN, while PKM2 and eEF1A1 significantly down-regulated in SCC compared with those in CIN. [Conclusion] The differentially expressed proteins between CIN and SCC are potentially candidate markers for early diagnosis of cervical cancer

Subject words: cervical intraepithelial neoplasia; cervical neoplasms; proteomics; DIGE, S100A9; eEF1A1; PKM2

宫颈癌是女性第二常见的恶性肿瘤。近年来宫颈鳞癌发病有年轻化的趋势^[1]。随着筛查技术和早期

基金项目: 北京市教育委员会科技计划面上项目(KM200910025025)
通讯作者: 吴玉梅, 科主任, 主任医师, 博士; 首都医科大学附属北京妇产医院妇科, 北京市东城区骑河沿大街骑河楼街 17 号北京妇产医院(100006); E-mail: wym-530@sohu.com。

收稿日期: 2011-10-14; 修回日期: 2012-04-16

治疗技术的增多, 宫颈癌已取得了非常好的防治效果^[2], 但尚缺乏高敏感性、高特异性的早期诊断技术^[3]。宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是一组与宫颈浸润癌密切相关的癌前病变, 包括宫颈非典型增生和宫颈原位癌, 反映了宫颈

癌发生的连续发展过程,也是宫颈癌防治的重要阶段。根据细胞改变程度和异型细胞范围可将 CIN 分为三级:CIN I、CIN II、CIN III,各级发展为宫颈癌的危险分别为 1%、5%及 12%~22%,CIN 总体发展为原位癌的概率为正常宫颈的 20 倍,发展为浸润癌的概率为正常宫颈的 7 倍^[4,5]。至今 CIN 发展为宫颈浸润癌的发病机制尚不明确,如何能有效地阻断 CIN 向宫颈浸润癌发展是迫切需要解决的问题。

本研究对 CIN 与宫颈鳞癌 (squamous cervical carcinoma, SCC) 组织进行蛋白质组学比较,并对其显著差异表达的蛋白质钙结合蛋白 A9(S100A9)、丙酮酸激酶 M2 (isoform M2 of pyruvate kinase isozymes, PKM2) 和真核延长因子 1A1 (eukaryotic elongation factor 1-alpha, eEF1A1) 进行验证。

1 资料与方法

1.1 病例来源

筛选 2008 年 8 月至 2009 年 9 月首都医科大学附属北京妇产医院收治的患者宫颈组织 39 例,其中 SCC 组织 7 例(根据 FIGO 2000 分期标准: I b 期 3 例, II a 期 4 例), CIN 组织 23 例(CIN I 为 7 例、CIN II 为 8 例、CIN III 为 8 例),正常宫颈组织(因子宫肌瘤行全子宫切除的正常宫颈组织)9 例。手术中收集组织离体后 30min 内放入液氮中,然后转移至-80℃冰箱保存。

以上病理诊断均经 2 名病理学专家核实,患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器

IPG 胶条(IPGstrip pH3-10)、CyDye DIGE Fluors 试剂盒等为 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) 公司产品。 β -actin、抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司、一抗分别为 abcam 公司的兔抗人 PKM2 多抗、兔抗人 eEF1A1 多抗、鼠抗人 S100A9 单抗。PV-9000 试剂盒及 DAB 试剂盒均购自 Lab Vision 公司。

一向等电聚焦仪 IPGphor、循环水浴 MultiTemp III、垂直电泳仪 Ettan DaltSix、图像扫描仪 Image Scanner、Typhoon9410、图像分析软件 Image Master 2D Elite 3.01、Image Quant、DeCyder™ 2D Version 6.5 均为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品;Protean

II 垂直电泳单元(Bio-Rad);基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱仪 MALDI-TOF-MS/MS 4700 Proteomics Analyser 及 GPS explorer 数据库检索软件(Applied Biosystem)。

1.3 方法

1.3.1 二维荧光差异凝胶电泳(2-D DIGE)及 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定

将-80℃保存的组织标本放入预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中清洗 3 遍,吸干、剪碎、裂解、高速离心后,采用改良 Bradford 方法进行蛋白定量。遵循正反标和内标的原则,即每个实验组都含有荧光染料 Cy3 和 Cy5 的标记,每块胶都有统一的 Cy2 标记的内标,将各组样品分别用 Cy2、Cy3、Cy5 标记后进行二维电泳。规格为 24cm, pI 3~10, 线性 IPG Amersham 胶条。第一向等电聚焦(isoelectrofocusing, IEF):采用胶内溶胀上样,蛋白质上样量为 50 μ g,上样体积为 450 μ l。溶胀和 IEF 的操作参数:30V 6h \rightarrow 60V 6h \rightarrow 100V 1h \rightarrow 250V 1h \rightarrow 500V 1h \rightarrow 1000V 1h \rightarrow 10000V 1h \rightarrow 10000V 80000Vh。第二向十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE):以 10mA 电流运行 1h, 15mA 运行 15h。使用 Typhoon 9410 荧光扫描仪扫描, DeCyder™ 2D version 6.5 软件处理,分别用胶内差异分析模块(differential ingel analysis, DIA)、生物学差异分析模块(biological variation analysis, BVA)进行分析。标记出差异表达蛋白质点。将选定的差异蛋白质点在凝胶上切取,脱色,15ng/ μ l 的胰蛋白酶酶解,2.5%四氟乙酸和 50%乙腈提取肽段并点靶。采用美国 ABI-4800 型反射式串联基质辅助激光解析吸附飞行时间质谱仪。一级质谱激光能量 4 200, 二级质谱激光能量 4 800。ABI 4800 GPS 软件检索 IPI-HUMAN V3.52 数据库进行生物信息学分析。

1.3.2 免疫组织化学

石蜡切片,脱蜡,梯度酒精水化, PBS 洗,高压柠檬酸 6.0 修复,3% H_2O_2 灭活内源性酶;滴加即用型一抗(abcam 公司的兔抗人 PKM2 多抗 1:100;兔抗人 eEF1A1 多抗 1:200;鼠抗人 S100A9 单抗 1:40),在湿盒中室温孵育 30min,4℃冰箱过夜;滴加二抗(非生物素化 PV-9000),试剂 1 为 15min,试剂 2 为 15min, PBS 洗 2min \times 5 次;DAB 显色,苏木素复染,

脱水封片,光镜观察。以普通 HE 染色切片为对照,采用双盲法进行评价,根据染色程度和阳性细胞百分率评分,进行定性分析。染色强度评分标准:细胞无染色为 0 分,细胞染色呈浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞百分率评分标准: < 5% 计 0 分, 6%~25% 计 1 分, 26%~50% 计 2 分, 51~75% 计 3 分, >75% 计 4 分。将两项评分相乘后, 0 分为阴性(-), 1~4 分为弱阳性(+), 5~8 分为阳性(++), 9~12 强阳性(+++). (-)与(+)为低表达,定义为阴性; (++)与(+++)为高表达,定义为阳性。

1.3.3 蛋白免疫印迹

将组织充分研磨后离心取上清,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白质浓度测定,配置 SDS-PAGE 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行电泳。采用干转法电转,取出 PVDF 膜,放入封闭液(5% 牛奶、PBST 液)中封闭 1h, PBST 液洗膜 10min, 5 次;加入一抗溶液(一抗分别为 abcam 公司的兔抗人 PKM2 多抗、兔抗人 eEF1A1 多抗、鼠抗人 S100A9 单抗, 1:2 000)于起伏板 4℃ 过夜,用 PBST 漂洗 10min×5 次;加入二抗溶液(相应抗鼠或抗兔第二抗体, 0.7:500)中室温孵育 1h。PBST 漂洗 10min×5 次;化学发光显色液显色;X 线胶片压片、定影、扫描。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析及均数的两两比较, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2-D DIGE 检测差异蛋白

DeCyder 软件分析(设置差异倍数为 1.5 倍以上)结果显示,以正常宫颈组织为对照, CIN 与 SCC 组织共有 46 个显著差异表达的蛋白质点。见图 1。

2.2 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定部分差异表达蛋白质结果

从 46 个差异蛋白质点中选取 30 个点分析,成

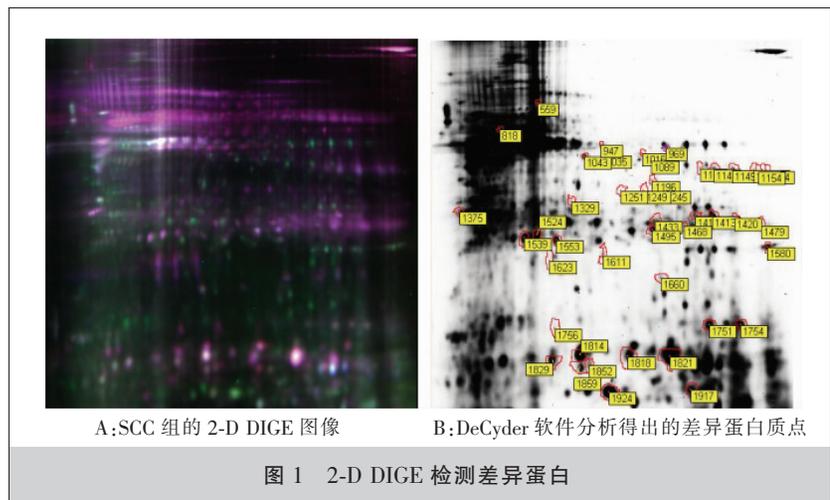


图 1 2-D DIGE 检测差异蛋白

表 1 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定蛋白质结果(下调组)

蛋白质序号	P _t 检验	蛋白质名称	序列编号	蛋白质得分可信度(%)	串联质谱离子得分可信度(%)	蛋白质分子量	蛋白质等电点
1149	0.001	IGHG1	100448938	100.000	100.000	51989.9	8.69
1149	0.005	cDNA FLJ 78387	100876888	100.000	92.513	52248.0	8.44
1149	0.005	Factor VII	100382606	100.000	100.000	77386.1	6.60
1411	0.010	ALB	100216773	100.000	99.402	46441.9	5.77
1660	0.003	eEF1A1	100472724	100.000	99.856	50495.3	9.15
1756	0.032	TTR	100022432	100.000	100.000	15991.1	5.52
1249	0.014	SOD3	100027827	100.000	95.043	26290.8	6.14
1249	0.014	TPSB2	100382751	100.000	99.983	26199.3	6.34
1249	0.014	TPSAB1	100472739	100.000	99.754	29970.1	6.62
1495	0.003	ALB 23kDa	100878282	100.000	100.000	23414.2	5.93
1413	0.005	HBB	100654755	100.000	100.000	16102.3	6.75
1433	0.014	IGKC	100430847	99.997	99.898	26032.8	8.18
1623	0.025	cDNA FLJ 60461	100909207	100.000	100.000	20208.7	8.90
1089	0.010	cDNA FLJ 56065	100479186	100.000	99.988	66459.0	7.96
1089	0.010	PKM2	100220644	100.000	88.226	58538.1	7.60
1539	0.010	Apolipoprotein A1	100021841	100.000	99.999	30758.9	5.56

表 2 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定蛋白质结果(上调组)

蛋白质序号	P_t 检验	蛋白质名称	序列编号	蛋白质得分可信度(%)	串联质谱离子得分可信度(%)	蛋白质分子量	蛋白质等电点
969	0.012	cDNA FLJ 52842	100894365	100.000	100.000	39542.7	5.40
1924	0.027	S100A11	100013895	100.000	100.000	11846.9	6.56
1043	0.001	PKM2	100220644	100.000	100.000	58538.1	7.60
1917	0.002	S100A8	100007047	100.000	99.585	10884.7	6.51
947	0.002	Tubulin beta chain	100011654	100.000	100.000	50095.1	4.78
1814	0.000	S100A9	100027462	100.000	100.000	13290.5	5.71
1553	0.029	GSTP1	100219757	100.000	100.000	23569.1	5.43
1859	0.000	S100A7	100219806	100.000	100.000	11577.6	6.28
1196	0.035	ENO1 Isoform	100465248	100.000	100.000	47481.4	7.01
1754	0.050	PPIA	100419585	100.000	100.000	18229.0	7.68

功鉴定出 25 个蛋白质, 其中 9 个蛋白质(ENO1、GSTP1、PPIA、S100A7、S100A8、S100A9、S100A11、 β -tubulin 等) 水平上调, 15 个蛋白质(Apolipoprotein A1、eEF1A1、FactorV II、HBB、IGHG1、IGKC、SOD3、TPSB2、TPSAB1、TTR 等) 水平下调, 1 个蛋白质(PKM2)同时出现于上调及下调组。见表 1 和表 2。

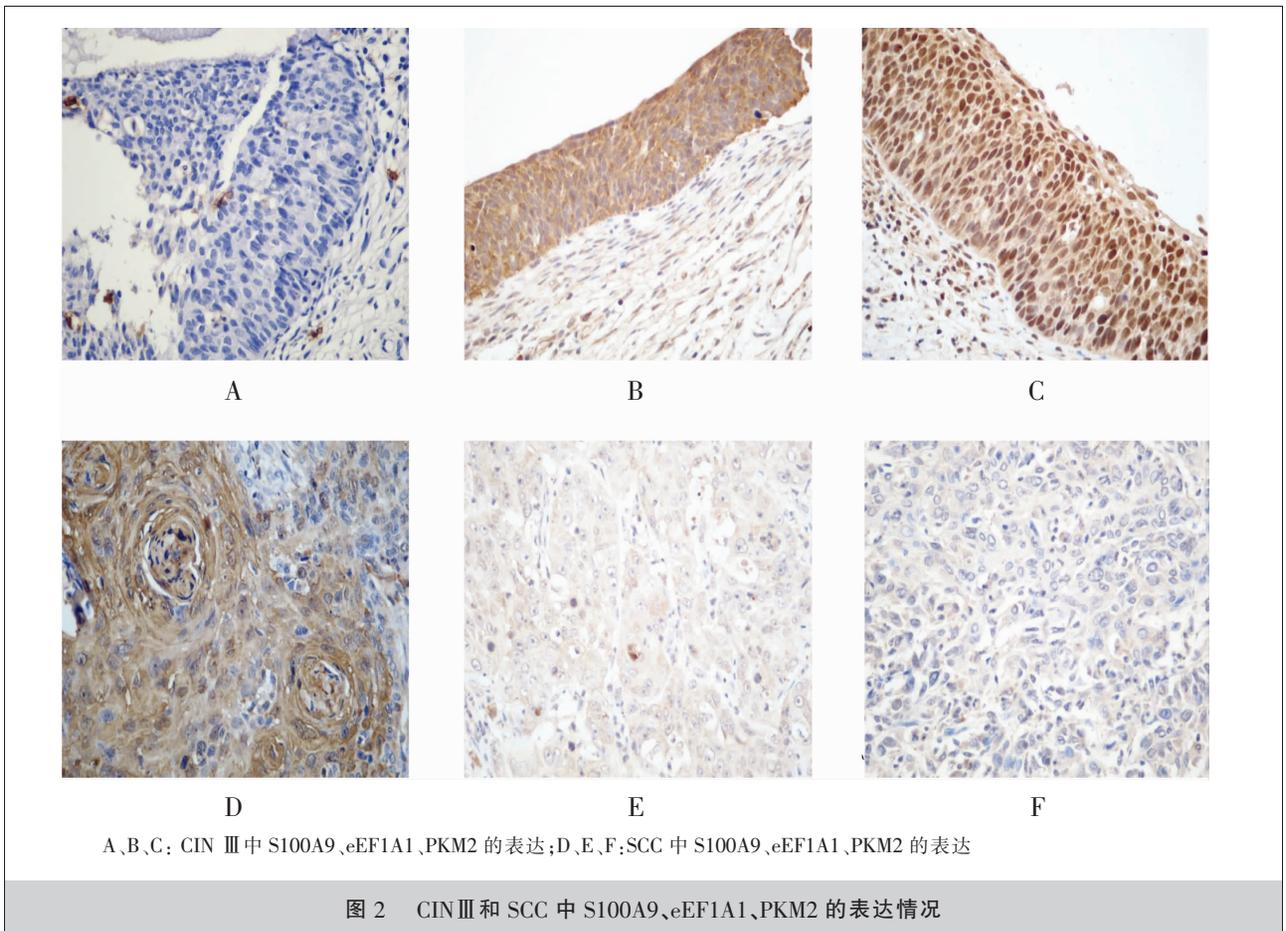
2.3 验证实验结果

综合差异蛋白的表达水平、功能、意义及国内外

近期的蛋白质组学研究成果, 在 25 个差异蛋白质中选取了显著上调的 S100A9、显著下调的 eEF1A1 及同时出现于上调组与下调组的 PKM2 进行验证。

2.3.1 免疫组织化学验证

S100A9 及 eEF1A1 表达于细胞浆, PKM2 表达于细胞核, PKM2、eEF1A1 在 SCC 中的表达较 CIN 稍低, 而 S100A9 在 CIN III 中表达较其他各组降低, 但在宫颈鳞癌的角度处表达显著。见图 2。



2.3.2 蛋白免疫印迹验证

从正常宫颈→CIN I →CIN II →CIN III →SCC, S100A9 表达上调($P=0.330$), eEF1A1 表达下调($P=0.010$), PKM2 表达下调($P=0.000$), 与免疫组化实验结果基本相符。见图 3。

3 讨论

肿瘤的发生和发展是多基因参与的复杂过程, 基因是遗传信息的源头, 但蛋白质是基因功能即生命活动的最终执行者, 所以蛋白质准确、直观、动态地反映了细胞内部的基因组成及环境因素对其的影响。CIN 反映了宫颈浸润癌发生、发展的连续、渐进的过程, 即由 CIN I →CIN II →CIN III →早期浸润癌→浸润癌。本课题采用 2-D DIGE 和 MALDI-TOF/TOF MS 比较了 CIN 与 SCC 的差异蛋白质组, 并选择 3 个显著差异蛋白 S100A9、eEF1A1 及 PKM2 进行免疫组化定性验证和免疫印迹定量验证, 目的是识别与宫颈癌前病变进展为宫颈癌相关的生物标志物, 这些标志物可能有助于揭示 CIN 发展为宫颈癌的发病机制, 有助于宫颈癌早期诊断、判断预后、监测病情变化, 并可能成为阻断 CIN 向宫颈浸润癌进展的治疗靶点等。

S100A9 是 S100 钙结合蛋白家族一员, 也称为 MRP14 或钙粒蛋白 B, 具有各种钙介导的细胞功能, 包括调控细胞生长、分化、转移、黏附及信号转导等^[6]。并常与 S100A8 形成异质二聚体复合物, 即免疫原性蛋白——钙卫蛋白, 参与多种炎症反应, 利于

宿主清除肿瘤细胞, 在多种肿瘤中高表达^[7,8]。朱红等^[9]应用蛋白质组学方法观察了 S100A9 在同时放化疗敏感性不同的中分化 SCC 组织中的表达及与敏感性的关系, 结果发现 S100A9 在高敏感组中的表达水平较低敏感组中高, 可能作为同时放化疗敏感性预测的标志物。另有研究发现 S100A9 在 CIN 及 SCC 中呈高表达水平^[10]。本研究中应用蛋白质组学研究发现随宫颈病变程度的加重, S100A9 表达水平逐渐增高, 免疫组化提示 S100A9 的表达水平与 SCC 的角化程度相关, 蛋白免疫印迹定量法结果提示从正常对照组到鳞癌组, S100A9 表达上调, 与 2-D DIGE 结果相符, 虽然各组之间差异无统计学意义($P=0.330$), 但 S100A9 表达水平的升高可能提示宫颈病变的严重程度。进一步研究 S100A9 表达水平与宫颈病变组织角化程度的相关性将有助于明确这种蛋白对 SCC 诊断的参考价值。

丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)是糖酵解途径中的关键酶, 有 4 种同工酶: L、R、M1、M2 型, 这 4 种同工酶的分布具有组织特异性。PKM2 存在四聚体和二聚体两种形式, 前者对底物磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP) 的亲合力高, 决定了 PKM2 同工酶的动力学特点, 而后者对 PEP 的亲合力低并在多种肿瘤中特异性高表达^[11], 故后者也称为 Tu M2-PK(pyruvate kinase tumor M2), 反应了肿瘤的代谢活性及增殖能力。Landt 等^[12]对宫颈癌前病变、宫颈浸润癌及复发性宫颈癌患者的 Tu M2-PK 进行了检测分析, 采用定量免疫分析法发现 Tu M2-PK 在 3 组患者血浆中的浓度依次升高, 差异有统计

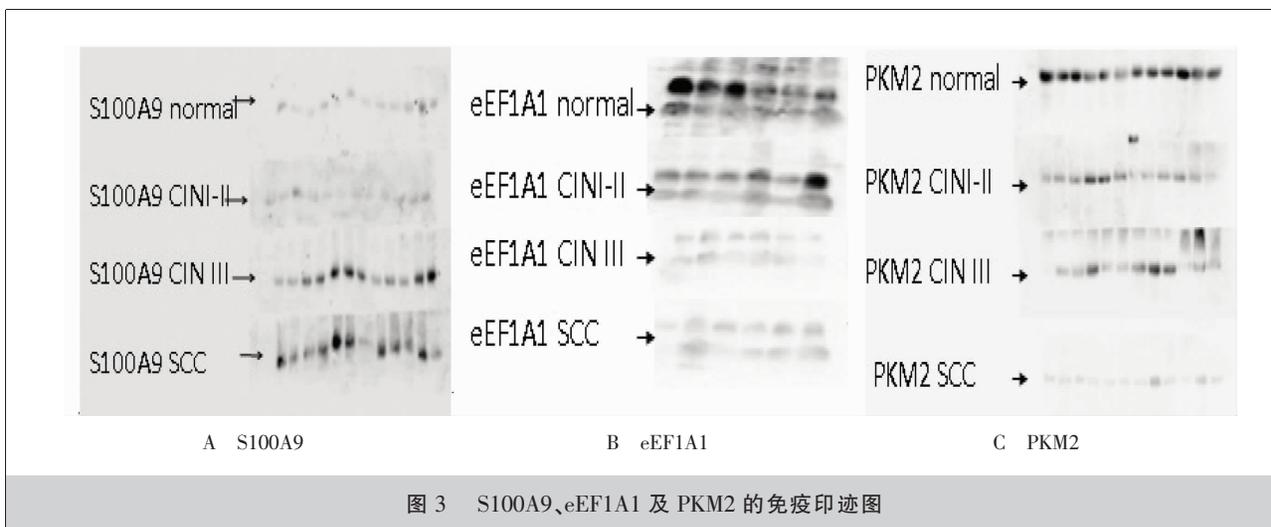


图 3 S100A9、eEF1A1 及 PKM2 的免疫印迹图

学意义,并采用免疫组织化学验证了上述结论,同时发现 Tu M2-PK 的表达水平与临床 FIGO 分期密切相关,即 Tu M2-PK 的表达水平随 FIGO 分期的增加而增加。本研究中蛋白质组学实验中 PKM2 同时见于差异蛋白表达上调组及下调组,验证实验提示 PKM2 表达水平随病变程度加重而降低,与 Landt^[12] 结果不一致,考虑 PKM2 可能同时以二聚体及四聚体的形式存在,尚需进一步扩大样本量研究。

eEF1A1 作为延长因子,运载氨基酰-tRNA 使肽链延长,同时具有 GTP 酶活性,保证蛋白质合成的准确性和速度。eEF1A 参与多种细胞活动,包括胚胎发生、致癌性转化、细胞增殖及细胞支架形成等^[13]。宫颈癌抑制因子 3 (cervical cancer suppressor-3, CCS-3) 是 eEF1A 的同型异构体,与 eEF1A 作用相反,在宫颈细胞株及宫颈癌中的表达水平低于相应的正常组织,人宫颈癌细胞株中的 CCS-3 过表达通过诱导凋亡和抑制细胞周期蛋白 A2 启动子活性而抑制细胞生长^[14]。本研究中 eEF1A1 表达水平随 CIN I → CIN II → CIN III → SCC 的变化呈下调趋势,与 eEF1A1 在恶性肿瘤中呈高表达^[15] 的研究结果不同,与 CCS-3 的表达情况一致,可能为揭示 CIN 向宫颈癌发生的机制提供新的线索。

本研究发现 CIN 与 SCC 之间的 25 个差异蛋白质,其功能涉及到代谢、转移、生长增殖及免疫调节等,它们均与肿瘤发生、发展密切相关,有待于进一步研究。

综上所述,本研究使用比较蛋白质组学,筛选并初步验证差异表达蛋白质,可能为阐明 CIN 发展为 SCC 机制提供新线索。

参考文献:

[1] 赵方辉,胡尚英,张思维,等.2004-2005 年中国居民子宫颈癌死亡情况及 30 年变化趋势[J].中华预防医学杂志,2010,44(5):408-412.

[2] Whitlock EP,Vesco KK,Eder M,et al.Liquid-based cytology and human papillomavirus testing to screen for cervical cancer: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force [J].Ann Intern Med,2011,155(10):687-697.

[3] Breitenacker G. Cervical cancer screening:past-present-fu-

ture[J]. Pathology,2009,30(Suppl 2):128-135.

[4] 郎景和.子宫颈癌预防的现代策略[J].中国医学科学院学报,2007,29(5):575-578.

[5] Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review [J]. Int J Gynecol Pathol,1993,12(2):186-192.

[6] Lukanidin E,Sleeman JP. Building the niche: the role of the S100 proteins in metastatic growth [J]. Semin Cancer Biol,2012[Epub ahead of print].

[7] Kim HK,Reyzer ML,Choi IJ,et al. Gastric cancer-specific protein profile identified using endoscopic biopsy samples via MALDI mass spectrometry[J]. J Proteome Res,2010,9(8):4123-4130.

[8] Su YJ,Xu F,Yu JP,et al. Up-regulation of the expression of S100A8 and S100A9 in lung adenocarcinoma and its correlation with inflammation and other clinical features [J]. Clin Med J,2010,123(16):2215-2220.

[9] Zhu H,Pei HP,Zeng S,et al. Profiling protein markers associated with the sensitivity to concurrent chemoradiotherapy in human cervical carcinoma[J]. Proteome Res,2009,8(8):3969-3976.

[10] Koskimaa HM,Kurvinen K,Costa S,et al. Molecular markers implicating early malignant events in cervical carcinogenesis[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2010,19(8):2003-2012.

[11] Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells [J]. Int J Biochem Cell Biol,2011,43(7):969-980.

[12] Laudt S,Jeschke S,Koeninger A,et al. Tumor-specific correlation of tumor M2 pyruvate kinase in pre-invasive, invasive and recurrent cervical cancer[J]. Anticancer Res,2010,30(2):375-381.

[13] Lamberti A,Caraglia M,Longo O,et al. The translation elongation factor 1A in tumorigenesis,signal transduction and apoptosis: review article[J]. Amino Acids,2004,26(4):443-448.

[14] Rho SB,Park YG,Park K,et al. A novel cervical cancer suppressor 3 (CCS-3) interacts with the BTB domain of PLZF and inhibits the cell growth by inducing apoptosis [J]. FEBS Lett,2006,580(17):4073-4080.

[15] Thornton S,Anand N,Purcell D,et al. Not just for house-keeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis[J]. J Mol Med,2003,81(9):536-548.