

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.20.020

RNA 结合基序蛋白 25 在肺腺癌组织中的表达及与预后的关系

韩学艳,李 畅[△]

(南京医科大学附属淮安第一医院检验科,江苏淮安 223001)

摘要:**目的** 探讨肺腺癌组织中 RNA 结合基序蛋白 25(RBM25)的表达以及与临床病理参数、患者预后之间的关系。**方法** 采用免疫组织化学法检测 75 例肺腺癌组织和相应癌旁组织中 RBM25、Ki-67 和 B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)的表达水平,并分析肺腺癌组织中的 RBM25 表达与患者临床病理参数、患者预后的关系。**结果** 在 75 例肺腺癌组织中 RBM25 表达的阳性率为 13.3%,明显低于相应癌旁组织的 93.3%($P<0.05$); RBM25 表达阳性率与肿瘤大小、TNM 分期相关($P<0.05$),而与性别、年龄、病理分级和淋巴结转移无相关性($P>0.05$)。生存分析显示,RBM25 阳性患者的累计生存率为 60.00%,明显高于 RBM25 阴性患者的 26.15%($P<0.05$)。肺腺癌组织中 RBM25 表达与 Ki-67 和 Bcl-2 均呈负相关关系($r=-0.259$ 、 -0.338 , $P<0.05$)。**结论** RBM25 在肺腺癌组织中低表达,而其低表达可能与肿瘤增殖及患者的不良预后相关。

关键词:RNA 结合基序蛋白 25; 肺腺癌; Ki-67; B 细胞淋巴瘤 2; 免疫组织化学

中图法分类号:R734.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)20-3069-04

Expression of RNA binding motif 25 in lung adenocarcinoma tissue and its relationship with prognosis

HAN Xueyan, LI Chang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Huaian No. 1 Hospital of Nanjing Medical University, Huaian, Jiangsu 223001, China)

Abstract:**Objective** To investigate the relationship between RNA binding motif 25 (RBM25) expression in lung adenocarcinoma tissue with clinicopathological parameters and prognosis in the patients with lung adenocarcinoma. **Methods** The expression levels of RBM25, Ki-67 and Bcl-2 in 75 cases of lung adenocarcinoma tissues and corresponding paracancerous tissues were detected by adopting the immunohistochemical method. The relationship between RBM25 expression in lung adenocarcinoma tissues with clinicopathological parameters and prognosis of the patients was analyzed. **Results** The positive rates of RBM25 expression in lung adenocarcinoma tissues of 75 cases of lung adenocarcinoma was 13.3%, which was significantly lower than 93.3% in the corresponding paracancerous tissues ($P<0.05$). The RBM25 expression positive rate was correlated with the tumor size and TNM stage ($P<0.05$), while had no correlation with the sex, age, pathological stage and lymph node metastasis ($P>0.05$). The survival analysis showed that the cumulated survival rate of the patients with positive RBM25 was 60.00%, which was significantly higher than 26.15% in the patients with RBM25 negative ($P<0.05$). The expression of RBM25 in the lung adenocarcinoma tissues was negatively correlated with Ki-67 and Bcl-2 ($P<0.05$). **Conclusion** RBM25 is lowly expressed in lung adenocarcinoma tissues, and its low expression may be associated with tumor proliferation and poor prognosis of the patients.

Key words: RBM25; lung adenocarcinoma; Ki-67; B cell lymphoma 2; immunohistochemistry

肺腺癌是非小细胞肺癌主要的组织学亚型,由于其早期临床症状不明显,并缺乏有效的治疗手段,因此仍然是导致患者死亡的重要原因^[1]。手术切除被认为是治疗肺腺癌较为激进的手段,但由于大多数患者在住院期间即被诊断为进展期肺腺癌,往往失去了根治性手术的机会^[2]。此外,化学治疗和放射治疗是标准的一线 and 二线治疗肺腺癌手段,但疗效尚不理想。在美国,只有约 15% 的患者在被诊断为肺腺癌后 5 年后仍可存活^[3]。因此,寻求肺腺癌新的治疗手段

迫在眉睫,而功能基因和生物学标志物作为近年来肿瘤研究的热点,给肺腺癌患者的诊断和治疗提供了新的方向。

剪接因子 RNA 结合基序蛋白 25(RBM25)在真核生物中的表达较为保守^[4]。据报道,其可通过调节基因 BCL2L1 的促凋亡和抗凋亡转录物的平衡来促进 HeLa 细胞凋亡^[5],并可在心力衰竭期间导致 SCN5A 编码的心电压门控钠离子通道截断^[6]。但关于 RBM25 在肺腺癌中的表达和作用目前鲜见研究报

道。本研究观察了 RBM25 在肺腺癌组织中的表达情况,并分析其表达与患者临床病理参数以及预后之间的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 包含 75 对肺腺癌组织(肺腺癌组)及对应癌旁组织(癌旁组)的芯片购自上海芯超科技有限公司,包括完整的临床病理资料,如年龄、性别、淋巴结转移情况、肿瘤大小、TNM 分期和随访资料等,患者术前均未经化学治疗和放射治疗。

1.2 仪器与试剂 兔抗人 RBM25 抗体(稀释倍数 1 : 100)、Ki-67 抗体(稀释倍数 1 : 100)、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2, 稀释倍数 1 : 100)和鼠抗兔二抗均购于 Sigma 公司,免疫组织化学试剂盒购自上海威奥生物科技有限公司。

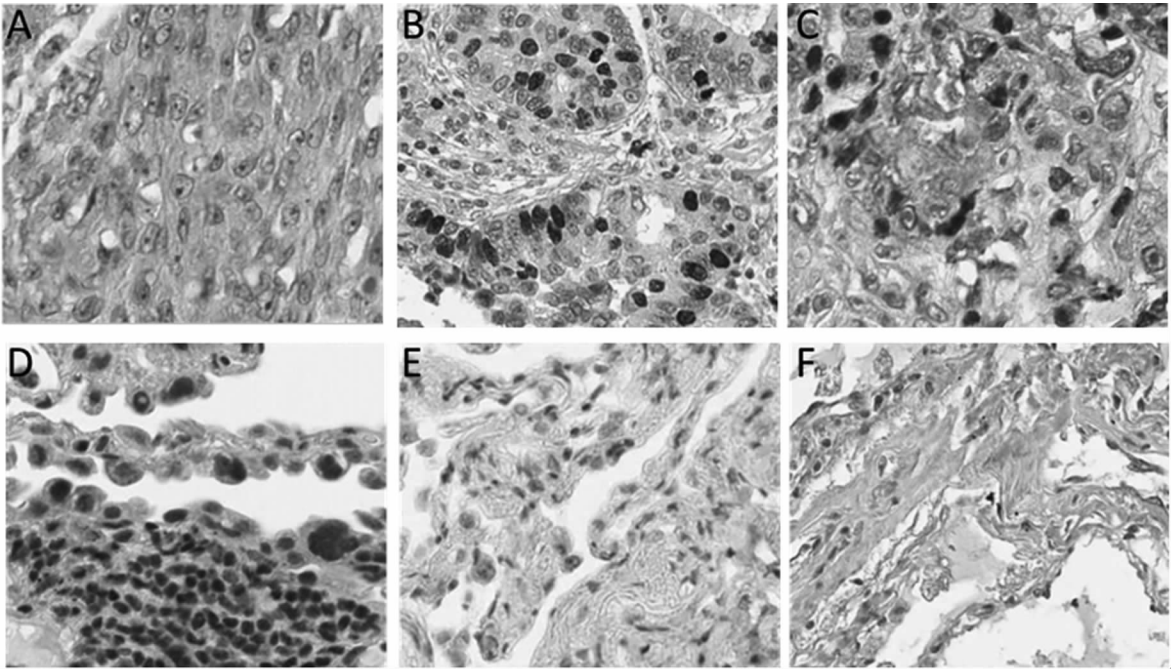
1.3 方法 免疫组织化学检测:芯片经 65 ℃烤片 15 min 后,使用二甲苯脱蜡,并用梯度乙醇脱水,5%的过氧化氢溶液浸润,放置于 37 ℃湿盒中孵育 15 min;经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后放置于 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH=6.0)中煮沸,自然冷却 30 min 用于抗原修复,使用羊血清工作液封闭,滴加一抗 4 ℃冰箱孵育过夜(每次试验均用已知阳性片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照),滴加生物素标记二抗,37 ℃孵育 30 min;再滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,37 ℃孵育 30 min,使用二氨基联苯胺(DAB)显色。

免疫组织化学结果判定:将各组的染色切片在光镜下观察、评分,同时进行病理图像采集。RBM 主要定位在细胞核,综合低倍镜下染色强度和高倍镜下阳性细胞百分数进行半定量测定。染色强度评分标准:基本不着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,黄褐色为 3 分。阳性细胞数百分比评分标准:组织芯片置于显微镜下计数 200 个细胞,阳性细胞百分数 < 10% 为 0 分; > 10% ~ 40% 为 1 分; > 40% ~ 70% 为 2 分; > 70% 为 3 分。两者相加 0 ~ 2 分评为阴性; > 2 ~ 6 分为阳性^[7]。结果由 2 位有资质的病理科医师进行判读,阴阳性判断不一致时,以第 3 位病理科医师的判读结果为准。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计数资料以率或例数表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法;相关性分析采用 Spearman 等级相关分析;采用 Kaplan-Meier 法评估总生存期,组间生存期的比较采用 Log-Rank 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 RBM25、Ki-67 和 Bcl-2 的表达情况 肺腺癌组中的 RBM25 阳性率为 13.3%, 低于癌旁组织中的 93.3%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。肺腺癌组中的 Ki-67 和 Bcl-2 阳性率均为 42.7%, 高于癌旁组的 6.6% 和 9.3%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。



注:A 为 RBM25 在肺腺癌组织中的表达;B 为 Ki-67 在肺腺癌组织中的表达;C 为 Bcl-2 在肺腺癌组织中的表达;D 为 RBM25 在癌旁组织中的表达;E 为 Ki-67 在癌旁组织中的表达;F 为 Bcl-2 在癌旁组织中的表达

图 1 RBM25、Ki-67 和 Bcl-2 阳性表达(SP, ×200)

2.2 不同临床病理参数间 RBM25、Ki-67、Bcl-2 阳性率比较 肿瘤直径 > 3 cm、TNM 分期 III ~ IV 期的

RBM25 阳性率明显低于肿瘤直径 ≤ 3 cm、TNM 分期 I ~ II 期的阳性率;肿瘤直径 > 3 cm、病理分级低分化的 Ki-67 阳性率明显高于肿瘤直径 ≤ 3 cm、病理分级高分化的阳性率;肿瘤直径 > 3 cm 的 Bcl-2 阳性率明显高于肿瘤直径 ≤ 3 cm 的阳性率,差异均有统计学意义($P<0.05$)。RBM25 的阳性率与患者的性别、年龄、病理分级、淋巴结转移无关;Ki-67 的阳性率与患者的性别、年龄、淋巴结转移、TNM 分期无关;Bcl-2 的阳性率与患者的性别、年龄、病理分级、淋巴结转移、TNM 分期无关($P>0.05$)。见表 2。

表 1 两组 RBM25、Ki-67 和 Bcl-2 阳性表达比较[n(%)]				
组别	n	RBM25	Ki-67	Bcl-2
肺腺癌组	75	10(13.3)	32(42.7)	32(42.7)
癌旁组	75	70(93.3)	5(6.6)	7(9.3)
χ^2		96.429	26.154	21.656
P		0.001	0.001	0.001

表 2 不同临床病理参数间 RBM25、Ki-67、Bcl-2 阳性率比较[n(%)]				
项目	n	RBM25	Ki-67	Bcl-2
性别				
男	43	6(14.0)	20(46.5)	20(46.5)
女	32	4(12.5)	12(37.5)	12(37.5)
年龄(岁)				
≥ 65	31	5(16.1)	11(35.5)	10(32.3)
< 65	44	5(11.4)	21(47.7)	22(50.0)
肿瘤直径(cm)				
> 3	46	0(0.0)	30(65.2)	32(69.6)
≤ 3	29	10(34.5) ^a	2(6.9) ^a	0(0.0) ^a
病理分级				
高分化	56	8(14.3)	20(35.7)	21(37.5)
低分化	19	2(10.5)	12(63.2) ^a	11(57.9)
淋巴结转移				
N ₀	38	7(18.4)	15(39.5)	17(44.7)
N ₁ ~N ₃	37	3(8.1)	17(45.9)	15(40.5)
TNM 分期				
I ~ II	46	10(21.7)	17(37.0)	19(41.3)
III ~ IV	29	0(0.0) ^a	15(51.7)	13(44.8)

注:与同组内指标比较,^a $P<0.05$

2.3 肺腺癌组中 RBM25 阳性表达与患者预后生存的关系 肺腺癌组中 RBM25 阳性表达患者的累积生存率为 60.00%,高于阴性表达患者的 26.15%($\chi^2=3.905, P=0.048$)。见图 2。

2.4 肺腺癌组织中 RBM25、Ki-67 和 Bcl-2 表达之间的相关分析 结果显示,RBM25 水平与 Ki-67 和 Bcl-2 均呈负相关($r=-0.259、-0.338, P<0.05$)。

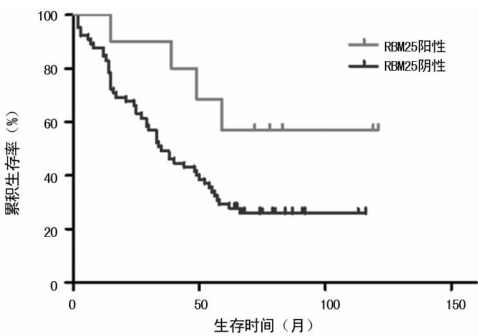


图 2 RBM25 不同表达患者的生存函数图

3 讨 论

肺腺癌是全球十大主要死亡原因之一。根据世界卫生组织的报告,2011 年有超过 150 万人死于肺腺癌^[3]。由于肺腺癌患者早期症状不明显,并且治疗手段的选择相对有限,绝大多数患者 5 年生存率不容乐观^[8]。因此,寻找肺腺癌可靠的预后标志物和有效的治疗靶点迫在眉睫。

前体 mRNA 的可变剪接过程,使得单个基因产生多个 mRNA 剪接体,是增加蛋白质多样性和调控基因表达的关键机制^[9]。大部分 RNA 结合蛋白可以通过识别位于外显子或内含子中的调节元件以及与剪接体因子或其他剪接调节物相互作用来影响剪接位点的选择^[8]。约 95% 的人类基因具有可变剪接的形式,提示可变剪接对人类基因组功能多样性具有重要的作用^[10]。现报道,包括肿瘤^[11]、神经退行性疾病^[12]、自身免疫性疾病^[13-14] 均与可变剪接有关。RBM25 属于一类 RNA 结合蛋白家族,其成员都拥有精氨酸-谷氨酸/精氨酸-天门冬氨酸的中心区域和 C-末端脯氨酸-色氨酸-异亮氨酸基序^[5]。RBM25 定位于细胞核并与多个剪接组分相关联,RBM25 的特征表明其在 mRNA 的可变剪接中起重要作用,并且这种调控是具有基因特异性的^[5]。RBM25 在肺腺癌中的研究目前较少有研究报道,因此探讨 RBM25 在肺腺癌中的作用是一项有意义的工作。

本研究结果显示,肺腺癌组织中 RBM25 的表达明显低于癌旁组织,进一步统计学分析结果显示,肺腺癌中 RBM25 的表达与肿瘤的直径、TNM 分期、Ki-67 和 Bcl-2 水平相关,肿瘤组织中 RBM25 表达越低,肿瘤直径越大,提示 RBM25 与肿瘤增殖相关。Bcl-2 抑制细胞凋亡,也是肿瘤预后指标,高表达者对多数化疗药物和放射治疗耐受^[15],RBM25 的表达越高,Bcl-2 表达越低,提示 RBM25 可能是通过影响细胞凋亡来促进肿瘤细胞增殖,与 ZHOU 等^[5]发现 RBM25 可以通过影响 Bcl-2 的表达来增强细胞凋亡进而抑制 HeLa 细胞增殖的报道相类似。RBM25 的表达越低,TNM 分期越高,提示 RBM25 参与了肺腺癌的发展。Ki-67 定位于细胞核,由于其表达变化具有周期性,在

有丝分裂期间水平达到高峰,因而被用作细胞增殖的标志物^[16],肿瘤组织中 RBM25 水平与 Ki-67 的表达呈负相关,提示 RBM25 也有可能是通过影响细胞有丝分裂来影响细胞增殖。本研究结果显示,RBM25、Ki-67 和 Bcl-2 与肿瘤增殖相关,并且 RBM25 还与 TNM 分期相关,Ki-67 与病理分级相关,提示 RBM25 在预估患者临床进程方面较 Ki-67 和 Bcl-2 更有优势。虽然近年来肺腺癌患者总体生存时间不断提高,但是在接受标准化治疗后,部分肺腺癌患者仍然会发生局部复发和远处转移,这突出了肺腺癌患者预后评估的重要性。生存分析结果表明,肺腺癌组织中 RBM25 的表达与患者累积生存时间呈正相关,RBM25 表达越高,肺腺癌患者累积生存时间越长。这些研究结果表明,RBM25 可作为肺腺癌患者预后的标志,结合 RBM25 的表达检测与目前肺癌的评估系统可能会为准确预测患者的预后和改善个性化治疗方案提供新的途径。

综上所述,RBM25 在肺腺癌组织中低表达,并且其低表达可能与肿瘤增殖、TNM 分期及患者预后相关,提示 RBM25 与肺腺癌的发生、发展相关。本研究今后需要进一步增加样本量,在体外细胞层面和体内试验中进一步验证 RBM25 与肿瘤增殖之间的关系,并探讨 RBM25 调控肺腺癌增殖的机制,以及 RBM25 是否能成为肺腺癌患者预后评估的标志物。

参考文献

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
- [2] AOKAGE K, YOSHIDA J, HISHIDA T, et al. Limited resection for early-stage non-small cell lung cancer as function-preserving radical surgery: a review[J]. Jpn J Clin Oncol, 2017, 47(1): 7-11.
- [3] HUANG W, HUANG H, WANG L, et al. SUN1 silencing inhibits cell growth through G0/G1 phase arrest in lung adenocarcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10(8): 2825-2833.
- [4] FORTES P, LONGMAN D, MCCracken S, et al. Identification and characterization of RED120: a conserved PWI domain protein with links to splicing and 3'-end formation[J]. FEBS Lett, 2007, 581(16): 3087-3097.
- [5] ZHOU A, OU A C, CHO A, et al. Novel splicing factor RBM25 modulates Bcl-x pre-mRNA 5' splice site selection[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(19): 5924-5936.
- [6] GAO G, XIE A, HUANG S C, et al. Role of RBM25/LUC7L3 in abnormal cardiac sodium channel splicing regulation in human heart failure[J]. Circulation, 2011, 124(10): 1124-1131.
- [7] YOO Y, KONG G, LEE M. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1alpha protein by recruiting histone deacetylase 1[J]. EMBO J, 2006, 25(6): 1231-1241.
- [8] ZONG F Y, FU X, WEI W J, et al. The RNA-binding protein QKI suppresses cancer-associated aberrant splicing[J]. PLoS Genet, 2014, 10(4): e1004289.
- [9] NILSEN T W, GRAVELEY B R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing[J]. Nature, 2010, 463(7280): 457-463.
- [10] XIPING Z, QING S W, SHUAI Z, et al. A summary of relationships between alternative splicing and breast cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(31): 51986-51993.
- [11] DANAN-GOTTHOLD M, GOLAN-GERSTL R, EISENBERG E, et al. Identification of recurrent regulated alternative splicing events across human solid tumors[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(10): 5130-5144.
- [12] GU J, CHEN F, IQBAL K, et al. Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates alternative splicing of tau exon 10; Implications for the pathogenesis of tauopathies[J]. J Biol Chem, 2017, 292(25): 10600-10612.
- [13] ODHAMS C A, CORTINI A, CHEN L, et al. Mapping eQTLs with RNA-seq reveals novel susceptibility genes, non-coding RNAs and alternative-splicing events in systemic lupus erythematosus[J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(5): 1003-1017.
- [14] GALARZA-MUNOZ G, BRIGGS F B, EVSYUKOVA I, et al. Human Epistatic Interaction Controls IL7R Splicing and Increases Multiple Sclerosis Risk[J]. Cell, 2017, 169(1): 72-84.
- [15] ADAMS J M, CORY S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 27-36.
- [16] ADAMO B, RITA RICCIARDI G R, IENI A, et al. The prognostic significance of combined androgen receptor, E-Cadherin, Ki67 and CK5/6 expression in patients with triple negative breast cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(44): 76974-76986.

(收稿日期: 2018-02-02 修回日期: 2018-05-05)