

## 肺腺癌组织中RNA结合基序蛋白38和p53基因的表达及其临床意义

尚自强<sup>1a</sup>, 童莹<sup>1b</sup>, 宋佳<sup>2</sup>, 薛亚斌<sup>1a</sup>, 况志星<sup>1c</sup>, 王洪江<sup>1a</sup> (1. 新疆医科大学附属肿瘤医院 a. 胸外科, b. 日间病房, c. 乳腺与淋巴瘤内科, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆维吾尔自治区肿瘤防治研究所, 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** **目的:** 分析肺腺癌组织中RNA结合基序蛋白38基因(RNA-binding motif protein 38, *RBM38*)及抑癌基因*p53* mRNA和蛋白的表达情况,探讨其在肺腺癌发生发展中的意义。**方法:** 取2012年10月至2015年6月新疆医科大学附属肿瘤医院收治的50例肺腺癌患者的肿瘤组织标本作为实验组,相对应的癌旁组织标本作为对照组。用RT-PCR法检测两组中*RBM38*及*p53* mRNA相对表达量,用Western blotting法检测两组中*RBM38*及*p53*蛋白的相对表达量。**结果:** 实验组*RBM38* mRNA及蛋白相对表达量(0.357±0.170、0.294±0.149)均高于对照组(0.271±0.128、0.206±0.099),实验组*p53* mRNA及蛋白(0.457±0.208、0.671±0.200)相对表达量均高于对照组(0.308±0.167、0.332±0.071),差异均有统计学意义(均*P*<0.01)。*RBM38*表达与肺腺癌患者TNM分期、浸润深度有关(*P*<0.05),*p53*表达与患者TNM分期有关(*P*<0.05)。实验组*RBM38*与*p53*蛋白表达呈负相关(*r*=-0.626,*P*<0.01)。**结论:** 肺腺癌组织*RBM38*、*p53* mRNA及蛋白表达均高于癌旁组织,两者均与患者TNM分期等病理参数关系密切。随着*RBM38*蛋白表达的增加*p53*蛋白随之减少,*RBM38*可能通过抑制*p53*的翻译从而促进肺癌的发生发展,*RBM38*可能成为肺腺癌分子靶向治疗的靶点。

**[关键词]** 肺腺癌; RNA结合基序蛋白38基因; *p53*基因

**[中图分类号]** R730.2; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)08-0900-04

## Expression and significance of RNA-binding protein 38 and *p53* gene in lung adenocarcinoma

SHANG Ziqiang<sup>1a</sup>, TONG Ying<sup>1b</sup>, SONG Jia<sup>2</sup>, XUE Yabin<sup>1a</sup>, KUANG Zhixing<sup>1c</sup>, WANG Hongjiang<sup>1a</sup> (1a. Department of Thoracic Surgery, b. Day Oncology, c. Department of Breast and Lymphoma, Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Research Institution of Cancer Prevention, Urumqi 830011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the mRNA and protein expressions of RNA-binding motif protein 38 (*RBM38* or *RNPC1*) and tumor suppressor gene *p53* in lung adenocarcinoma tissues, and to explore its significance in the occurrence and development of lung adenocarcinoma. **Methods:** Tumor tissue samples from 50 lung adenocarcinoma patients that treated in Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University were selected as the experiment group, and the corresponding adjacent tissue samples were taken as the control group. The relative mRNA expression of *RBM38* and *p53* in two groups were detected by RT-PCR method, and the relative protein expression of *RBM38* and *p53* were detected by Western blotting. **Results:** The mRNA and protein expressions of *RBM38* in the experimental group (0.357±0.170, 0.294±0.149) were higher than those of the control group (0.271±0.128, 0.206±0.099), and the mRNA and protein expressions of *p53* (0.457±0.208, 0.671±0.200) were higher than those of control group (0.308±0.167, 0.332±0.071); The difference was statistically significant (all *P* < 0.01). *RBM38* expression was related to TNM stage and depth of invasion in patients with lung adenocarcinoma (*P* < 0.05). The expression of *p53* was related to the TNM staging of the patients (*P*<0.05). The expression of *RBM38* and *p53* protein in the experience group were correlated (*r*=- 0.626, *P*<0.01). **Conclusion:** The mRNA and protein expressions of *RBM38* and *p53* in lung adenocarcinoma tissues were higher than that in adjacent tissues, and they were closely re-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81460354)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81460354)

**[作者简介]** 尚自强(1988-),男,硕士生,主要从事肺肿瘤诊断和治疗的研究, E-mail: shang861@qq.com

**[通信作者]** 王洪江(WANG Hongjiang, corresponding author), 博士,教授,博士生导师,主要从事胸部肿瘤的诊断和治疗研究, E-mail: whj71210@sina.com

lated to the pathological parameters of the patients, such as TNM staging. With the increase of RBM38 protein expression and decrease of p53 protein, RBM38 may promote the occurrence and development of lung cancer by inhibiting the translation of p53. RBM38 may be the target of molecular targeted therapy for lung adenocarcinoma.

**[Key words]** lung adenocarcinoma; RNA-binding motif protein 38 gene (*RBM38*); *p53* gene

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(8): 900-903. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.015]

肺癌是目前全世界发病率最高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。抑癌基因 *p53* 是细胞增殖的调控因子,其突变、失活在人体多种肿瘤的发生发展中起着重要作用。近年研究<sup>[2]</sup>显示, RNA结合基序蛋白38基因(RNA-binding motif protein 38, *RBM38*, 又称 *RNPC1*)可能抑制 *p53* 基因的翻译过程,从而促进肿瘤的发生发展。*RBM38*在结直肠癌、淋巴瘤等多种癌中高表达,但关于该基因在肺腺癌中的表达,国内外罕见报道。*RBM38*在人类肺腺癌中的表达情况及其与 *p53* 的关系尚未确定,为此本研究检测了肺腺癌组织中 *RBM38* 和 *p53* mRNA 及蛋白的表达情况,探讨 *RBM38* 及 *p53* 在肺腺癌发生发展中的意义,以期为肺腺癌的分子靶向治疗提供帮助。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取2012年10月至2015年6月新疆医科大学附属肿瘤医院胸外科收治的肺腺癌患者50例,根据2009年UICC和IASLC公布的第7版肺癌国际分期标准,其中, I a期3例、I b期13例、II a期10例、II b期6例、III a期15例、III b期3例。全组中男40例、女10例,年龄41~79(64.06±9.62)岁。所有患者均为手术切除肿瘤,标本取材前均经患者本人或家属充分知情同意并签字。每份标本均包括肺腺癌组织(实验组)和远隔癌组织5 cm以上癌旁组织(对照组)。患者术前均未行放疗及生物免疫治疗。取材后置于液氮中速冻,并移至-80℃冰箱保存备用。该研究经患者知情同意,并经医院伦理委员会审查并批准。

### 1.2 主要试剂及引物序列

TRIzol总RNA提取试剂购自Invitrogen公司,逆转录试剂盒(reverse transcription system A3500)、PCR扩增试剂盒购自Promega公司,鼠抗人RBM38单克隆抗体(A-8)、鼠抗人p53单克隆抗体(DO-126)购自美国Santa Cruz公司,通用二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,蛋白提取试剂盒(KGP2100)、蛋白测定试剂盒(KGPBCA)购自南京凯基生物公司。引物利用Primer5.0设计,并由上海生物工程股份有限公司合成。引物序列(5'-3')如下:RBM38的上游为ACTACCGACGCCTCGCTCAG,下游为CCCA-GATATGCCAGGTTAC; p53的上游为CTTTGAG-

GTGCGTGTGGTGTG,下游为TTCAGGTGGCTG-GAGTGAG; *GAPDH*(内参)的上游为CGCGGGCTCTCCAGAACATCAT,下游为CCAGCCCCAGC-GTCAAAGGTG。

### 1.3 RT-PCR法检测组织标本RBM38及p53 mRNA相对表达量

应用TRIzol法提取组织总RNA,紫外分光光度计检测所提RNA的纯度及浓度。将所得总RNA进行逆转录得cDNA,以cDNA为模板进行扩增。RBM38扩增条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,72℃ 7 min;共35个循环。p53扩增条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,72℃ 7 min;共35个循环。取扩增产物5 μl、Marker 3 μl,2%琼脂糖凝胶电泳;采用Imaging Lab图像分析软件对结果进行分析;目的基因RBM38积分光密度值与内参GAPDH积分光密度值的比值为RBM38 mRNA的相对表达量。同方法计算p53 mRNA的相对表达量。

### 1.4 Western-blotting法检测组织标本RBM38及p53蛋白相对表达量

按照试剂盒说明书进行蛋白提取及总蛋白浓度测定。于12%分离胶及5%浓缩胶上电泳,冰浴中转膜。转膜后5%脱脂牛奶室温封闭120 min,加入鼠抗人RBM38单克隆抗体(1:200)或鼠抗人p53单克隆抗体(1:200)或内参β-actin(1:500),4℃孵育过夜,孵育二抗(1:7 500)后使用ECL发光试剂盒曝光显影。所得图像采用Imaging Lab图像分析软件进行分析。目的蛋白RBM38或p53调整体积与同一标本内参蛋白β-actin调整体积的比值为RBM38或p53蛋白的相对表达量。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS16.0统计学软件。半定量及定量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较方差齐时采用 $t$ 检验,方差不齐时采用 $t'$ 检验;多组比较采用 $F$ 检验;相关性分析采用Pearson线性相关分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

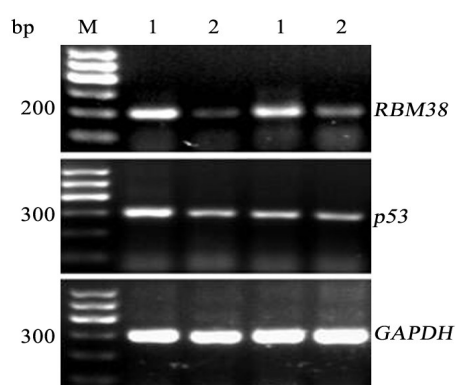
## 2 结果

### 2.1 RBM38及p53 mRNA及蛋白在肺腺癌组织中的高表达

检测结果(图1、图2)发现,肺腺癌组织RBM38

mRNA 相对表达水平显著高于癌旁组织 ( $0.357 \pm 0.170$  vs  $0.271 \pm 0.128$ ,  $P < 0.01$ )。肺腺癌组织 RBM38 蛋白相对表达量显著高于癌旁组织 ( $0.294 \pm 0.149$  vs  $0.206 \pm 0.099$ ,  $P < 0.01$ )。

肺腺癌组织及癌旁组织 p53 mRNA 及蛋白的相对表达量的差异结果与 RBM38 类似, 肺腺癌组织中 p53 mRNA 及蛋白的相对表达水平显著高于癌旁组织 ( $0.457 \pm 0.208$  vs  $0.308 \pm 0.167$ ,  $P < 0.01$ ;  $0.671 \pm 0.200$  vs  $0.332 \pm 0.071$ ,  $P < 0.01$ )。

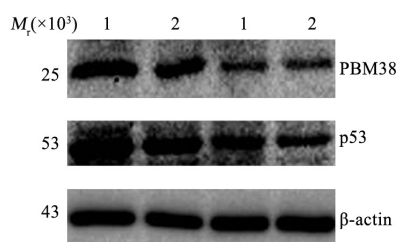


M: Marker; 1: Lung adenocarcinoma tissues; 2: Adjacent tissues

图1 肺腺癌及其癌旁组织 RBM38 及 p53 mRNA 的表达  
Fig. 1 Expression of RBM38 and p53 mRNA in lung adenocarcinoma and its adjacent tissues

### 2.2 肺腺癌组织中 RBM38 与 p53 mRNA 和蛋白表达的相关性

将 50 例患者癌组织中 RBM38 相对表达量与 p53 相对表达量通过 Pearson 线性相关分析, 结果 (图 3) 发现, RBM38 与 p53 蛋白表达呈负相关 ( $r = -0.626$ ,  $P < 0.01$ ), 两者 mRNA 表达则不相关 ( $r = 0.059$ ,  $P > 0.05$ )。



1: Lung adenocarcinoma tissues; 2: Adjacent tissues;

图2 肺腺癌及其癌旁组织 RBM38 及 p53 蛋白表达  
Fig. 2 Expression of RBM38 and p53 protein in lung adenocarcinoma and its adjacent tissues

### 2.3 肺腺癌组织中 RBM38 和 p53 mRNA 及蛋白表达与患者临床病理特征的关系

分析结果 (表 2) 显示, RBM38 mRNA 表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期有关 ( $P < 0.05$ ), 与年

龄、性别、分化程度均无关 ( $P > 0.05$ )。RBM38 蛋白表达与肿瘤浸润深度、TNM 分期有关 ( $P < 0.05$ ), 与年龄、性别、分化程度、淋巴结转移均无关 ( $P > 0.05$ )。

p53 mRNA 及蛋白相对表达水平均与肿瘤 TNM 分期有关 ( $P < 0.05$ ), 与年龄、性别、分化程度、浸润深度、淋巴结转移均无关 ( $P > 0.05$ )。

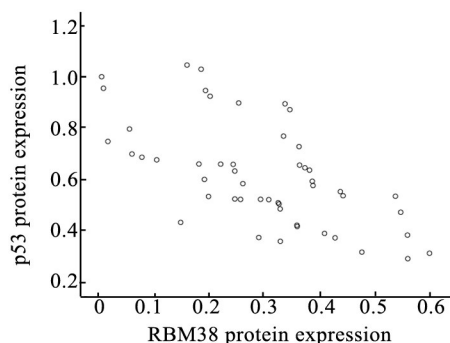


图3 肺腺癌组织中 RBM38 及 p53 蛋白表达的散点图  
Fig. 3 Expression of RBM38 and p53 protein in lung adenocarcinoma

## 3 讨论

众所周知抑癌基因 p53 在肿瘤发生发展中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。近年来研究发现 RBM38 与 p53 关系密切, RBM38 定位于 20q13, 它是 RNA 结合蛋白 (RNA recognition motif, RRM) 家族中的一员。RBM38 基因编码一个 RNA 结合蛋白 (RBP), 表达为两个亚型: 含有 239 个氨基酸的 RBM38a 和含 121 个氨基酸的 RBM38b<sup>[4]</sup>。

本研究将患者癌组织中 RBM38 基因表达量与癌旁组织进行配对 t 检验, 发现癌组织中 RBM38 表达水平高于癌旁组织, 提示 RBM38 表达与肺腺癌的发生发展存在相关性。用同样方法对 p53 表达量进行分析, 同样发现 p53 在癌组织中表达量较癌旁组织高。综合多个研究结果<sup>[5-10]</sup>表明, RBM38 基因位点在下列多种癌中表达活跃: 前列腺癌、卵巢癌、结直肠癌、慢性淋巴细胞白血病、食管癌和胃癌细胞 MGC-823。上述研究成果支持本研究结论。

本研究将 50 例患者癌组织中 RBM38 表达量与 p53 表达量进行相关分析, 结果显示 RBM38 mRNA 与 p53 mRNA 表达量不相关, 但其在蛋白表达上呈负相关。结合 Zhang 等<sup>[11]</sup>研究结果, 推测其分子机制为: RBM38 参与 p53 的翻译调控, RBM38a 阻止真核生物起始因子 4E (eukaryotic initiation factor, eIF4E) 结合 p53 mRNA。p53 基因 5' 端的非翻译区 (UTR) 或 3' 端 UTR 是 RBM38 与 p53 的结合区域。RBM38a 依赖其氨基端 RRM 结合在 p53 mRNA 上, 同时其羧基端控制区与 eIF4E 结合, 通过这种方式阻止 eIF4E

与p53 mRNA结合。其结果是翻译起始复合体被破坏,从而降低p53的翻译水平,而转录水平则未受到该机制影响。

表2 肺腺癌组织中RBM38、p53 mRNA及其蛋白表达与患者临床病理特征的关系( $\bar{x}\pm s$ )  
Tab. 2 The relationship between the expression of RBM38, p53 mRNA and protein and the clinicopathological characteristics of lung adenocarcinoma( $\bar{x}\pm s$ )

Parameters	n	RBM38 mRNA			RBM38 protein			p53 mRNA			p53 protein		
		Expression	t/F	P	Expression	t/F	P	Expression	t/F	P	Expression	t/F	P
Age (t/a)													
≤62	20	0.350±0.182	0.238	0.813	0.283±0.172	0.418	0.678	0.424±0.161	0.983	0.331*	0.643±0.236	0.751	0.457
>62	30	0.362±0.164			0.301±0.134			0.479±0.234			0.600±0.174		
Gender													
Male	40	0.360±0.174	0.228	0.821	0.293±0.147	0.089	0.930	0.456±0.206	0.044	0.965	0.623±0.212	0.432	0.668
Female	10	0.346±0.161			0.298±0.162			0.460±0.226			0.592±0.148		
Differentiation													
Poor	9	0.381±0.219			0.320±0.184			0.416±0.223			0.570±0.216		
Moderate	33	0.335±0.149	0.911	0.409	0.273±0.130	1.111	0.338	0.461±0.189	0.253	0.777	0.625±0.188	0.308	0.737
Well	8	0.421±0.196			0.353±0.177			0.486±0.282			0.637±0.247		
Invasion													
T1/T2	36	0.323±0.168	2.363	0.022	0.262±0.147	2.594	0.013	0.439±0.217	0.955	0.344	0.624±0.194	0.407	0.686
T3/T4	14	0.444±0.146			0.377±0.122			0.502±0.183			0.598±0.221		
Lymph node metastasis													
Yes	27	0.403±0.158	2.135	0.038	0.332±0.135	2.004	0.051	0.501±0.214	1.641	0.107	0.656±0.209	1.507	0.138
No	23	0.304±0.171			0.250±0.155			0.405±0.193			0.571±0.182		
TNM staging													
I/II	32	0.313±0.168	2.583	0.013	0.258±0.151	2.421	0.019	0.404±0.184	2.550	0.014	0.560±0.177	2.857	0.006
III	18	0.436±0.148			0.359±0.123			0.552±0.219			0.718±0.203		

本研究还发现RBM38 mRNA及蛋白表达水平与肺腺癌的浸润深度、TNM分期有关,且其相对表达水平随着浸润深度及TNM分期的增加而增加,提示随着RBM38基因表达的增加,肺腺癌患者临床病情也随之进展,由此考虑早期干预RBM38基因的表达或许能减缓或逆转肺腺癌患者病情的进展。

目前利用p53基因进行肿瘤治疗已经成为研究的热点<sup>[12]</sup>。RBM38则通过对p53的抑制在肿瘤发生发展中发挥着重要作用,其很可能成为人类肺癌靶向治疗的潜在靶点。

#### 【参考文献】

- TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- DING Z, YANG H W, XIA T S, et al. Integrative genomic analyses of the RNA-binding protein, RNPC1, and its potential role in cancer prediction[J]. Int J Mol Med, 2015, 36(2): 473-484. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2237.
- LIU J, ZHANG C, HU W, et al. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt A): 197-203. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.12.025.
- CHO S J, JUNG Y S, ZHANG J, et al. The RNA-binding protein RNPC1 stabilizes the mRNA encoding the RNA-binding protein HuR and cooperates with HuR to suppress cell proliferation[J]. J Biol Chem, 2012, 287(18): 14535-14544. DOI: 10.1074/jbc.M111.326827.
- 季春梅, 黄雯, 杨年钊, 等. RNPC1基因对胃癌细胞MGC-823增殖、迁移及侵袭的影响 [J]. 江苏医药, 2016, (5): 507-510.
- VARGA D, DENIZ M, SCHWENTNER L, et al. Ovarian cancer: in search of better marker systems based on DNA repair defects[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(1): 640-673. DOI: 10.3390/ijms14010640.
- LABBE D P, NOWAK D G, DEBLOIS G, et al. Prostate cancer genetic-susceptibility locus on chromosome 20q13 is amplified and coupled to androgen receptor-regulation in metastatic tumors[J]. Mol Cancer Res MCR, 2014, 12(2): 184-189. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0477.
- DU M, JIAO S, BIEN S A, et al. Fine-mapping of common genetic variants associated with colorectal tumor risk identified potential functional variants[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0157521. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4933364. DOI: 10.1371/journal.pone.0157521.
- 唐青青, 陆伟, 张海健, 等. 白血病人中RNA结合蛋白RNPC1的表达及意义[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, (5): 830-833. http://www.clinicmed.net/upload/pdf/201404/20140422013708457.pdf. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.05.005.
- FRANKEL A, ARMOUR N, NANCARROW D, et al. Genome-wide analysis of esophageal adenocarcinoma yields specific copy number aberrations that correlate with prognosis[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2014, 53(4): 324-338. DOI: 10.1002/gcc.22143.
- ZHANG J, CHO S J, SHU L, et al. Translational repression of p53 by RNPC1, a p53 target overexpressed in lymphomas[J]. Genes Dev, 2011, 25(14): 1528-1543. DOI: 10.1101/gad.2069311.
- 张仁峰, 公蕾. p53基因与肿瘤治疗研究进展[J]. 现代免疫学, 2016, 36(2): 150-153.

【收稿日期】 2017-03-02

【修回日期】2017-05-03

【本文编辑】 韩丹