

RNA 结合蛋白 RBM38 表达对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响

郭中叶, 蒋世一, 邱云, 廖克曼, 侯鹏, 鲁晓杰

【摘要】 目的 探讨 RNA 结合蛋白 RBM38 (RNA 结合基序蛋白 38, RNA-binding motif protein 38) 在胶质瘤组织和细胞中的表达水平及其对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的调节作用。方法 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测胶质瘤组织和瘤旁正常组织的 RBM38 表达水平。采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测胶质瘤细胞 U87、U251 和正常星形胶质细胞 HA1800 的 RBM38 表达水平。用免疫组化染色检测 59 例胶质瘤组织的 RBM38 表达水平, 并分析其与临床病理资料的关系。将靶向 RBM38 的特异性小干扰 RNA 运用脂质体介导转染法转染至胶质瘤细胞 U87 和 U251。应用 CCK-8 (cholecystokinin-8) 增殖实验、划痕实验、Transwell 小室实验、流式细胞仪测凋亡细胞, 检测 RBM38 对于胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡能力的影响。采用 qRT-PCR 检测抑制 RBM38 表达后肿瘤细胞 P53 基因的表达水平。结果 相较于瘤旁的脑组织, 胶质瘤组织 RBM38 的表达量明显升高 ($P < 0.05$)。胶质瘤细胞中的 RBM38 表达水平明显高于正常胶质细胞 (均 $P < 0.001$)。免疫组化结果显示, 与低级别胶质瘤相比, 高级别胶质瘤的 RBM38 表达水平更高 ($P < 0.05$)。抑制 RBM38 的表达后, 胶质瘤细胞 U87 和 U251 的增殖速率明显下降、迁移距离变短、能透过生物膜的细胞数目明显下降 (均 $P < 0.05$)。下调了 RBM38 的表达后胶质瘤细胞的凋亡比率升高 ($P < 0.05$)。被抑制了 RBM38 表达的胶质瘤细胞 P53 基因的表达水平升高 ($P < 0.05$)。结论 RBM38 在胶质瘤组织及细胞系中呈高表达, RBM38 的高表达与胶质瘤的临床分级密切相关。下调 RBM38 的表达后能抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力, 促进细胞的凋亡, 并使 P53 基因的表达水平增高; 可能为临床诊断和治疗胶质瘤提供新的靶点。

【关键词】 RNA 结合蛋白; RNA 结合基序蛋白 38; 胶质瘤; 细胞增殖; 细胞迁移

【中图分类号】 R739.41 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-7770(2019)04-0282-07

Effect of RNA-binding motif protein 38 on proliferation, migration and invasion of glioma cells

GUO Zhong-ye, JIANG Shi-yi, QIU Yun, et al. Department of Neurosurgery, The Affiliated Wuxi No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214000, China

Corresponding author: LU Xiao-jie

Abstract: Objective To investigate the expression level of RNA-binding motif protein 38 (RBM38) in glioma tissues and cells, and to identify its effects on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of glioma cells. **Methods** RBM38 mRNA levels in glioma tissues and normal adjacent tissues were analyzed using qRT-PCR (quantitative real-time PCR). RBM38 levels in glioblastoma cell line U87, U251 and human astrocyte HA1800 cells were detected using qRT-PCR and Western Blot. Additionally, the correlation between RBM38 expression in glioma tissues and the corresponding clinical pathological characteristics of the patients was explored, based on the IHC results of RBM38 expression in 59 human glioma tissues. Specific small interfering RNAs targeting RBM38 were transfected into glioma cell lines U87 and U251 using liposome-mediated transfection. The effects of RBM38 on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of glioma cells were examined by CCK-8 proliferation assay, scratch assay, transwell chamber assay and flow cytometry assay respectively. The qRT-PCR was conducted to detect the P53 expression in the

基金项目:江苏省省级科技专项资金(BL2013006)

作者单位:214000 无锡,南京医科大学附属无锡第二医院神经外科(郭中叶,邱云,侯鹏,鲁晓杰);宜兴市第一人民医院神经外科(蒋世一);上海交通大学附属仁济医院神经外科(廖克曼)

通信作者:鲁晓杰

RBM38-depleted glioma cells. **Results** The expression of RBM38 in glioma tissues was significantly higher, in comparison with that of normal adjacent tissues ($P < 0.05$). RBM38 levels were significantly up-regulated in glioma cell, compared with those in normal cells (all $P < 0.001$). Immunohistochemical results indicated RBM38 expression was higher in high-grade gliomas compared with low-grade gliomas ($P < 0.05$). The inhibition of RBM38 expression resulted in significantly reduced proliferation rate of U87 and U251 cells ($P < 0.05$), suppressed migration and invasion capacity of glioma cells ($P < 0.05$), and significantly enhanced apoptosis rate of glioma cells ($P < 0.05$). The expression level of P53 gene was significantly increased in the RBM38-depleted glioma cells ($P < 0.05$). **Conclusions** RBM38 expression is remarkably high in glioma tissues and cell lines. The high expression level of RBM38 is closely related to the clinical grade of glioma. Down-regulation of RBM38 can inhibit the proliferation, migration, invasion of glioma cells, promote cellular apoptosis, and improve the expression of P53 gene. The data demonstrate that RBM38 can be used as novel target for the clinical diagnosis and intervention of glioma.

Key words: RNA-binding protein; RNA-binding motif protein 38; glioma; cell proliferation; cell migration

RNA 结合蛋白 (RNA-binding protein, RBP) 在细胞转录后水平对基因的表达和调控起着重要作用^[1-2]。异常 RBPs 结合产物或 RBPs 突变均会导致癌症的发生。RNA 结合基序蛋白 RBM38 (RNA-binding motif protein 38, RBM38) 又名 RNPC1, 是 RNA 结合蛋白家族的一员。RBM38 可以调节 P21、P63、MDM2、巨噬细胞抑制因子 1 等基因 mRNA 的稳定性^[3-7]。研究发现, RBM38 既有促进肿瘤生长的作用^[8-10], 同时也有抑制肿瘤进展的作用^[11-14]。已有大量的研究显示, RBM38 在不同层面参与调控多种恶性肿瘤的进展和远处转移。但目前关于胶质瘤组织中 RBM3 表达水平的研究报道还很少。有关 RBM38 调控胶质瘤细胞恶性进展以及远处转移的具体作用机制的研究仍是欠缺的, RBM38 对胶质瘤细胞凋亡的影响也是未知的。本研究检测了胶质瘤组织及瘤旁组织、胶质瘤细胞和正常星形细胞的 RBM38 表达水平, 旨在探讨 RBM38 表达对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂 U87、U251、HA1800 细胞(中国医学科学院北京协和细胞资源中心), 细胞培养在血清浓度为 10% 的高糖 DMEM 培养基中, 放置于 37.3 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中。转染试剂 Lipofectamine 2000 和 RNA 抽提试剂 Trizol (美国 Invitrogen 公司); PCR 试剂盒 (QuantiFast SYBR Green PCR Kit, 德国 Qiagen 公司); 反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT Master Mix, 大连宝生物科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (日本同仁公司); 细胞凋亡检

测试剂盒 (BD Biosciences 公司); Transwell 小室 (美国 Corning 公司); Matrigel 基质胶 (美国 BD 公司)。鼠来源的 β -Actin 一抗、HRP 标记的二抗 (武汉三鹰生物技术有限公司); 兔来源的 RBM38 一抗 (美国 lifespan 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 依据 Trizol 说明书提取细胞中的 RNA, 使用超微量分光光度计测定 RNA 的浓度和质量。RBM38 的上游引物: 5'-GGGAAACCTGAAA-GCAAGAA-3', 下游引物: 5'-CGTGCCTGATGGAG-AAA-3'。GAPDH (内参基因) 的上游引物: 5'-AAGGTAAGGTCGGAGTCAA-3', 下游引物: 5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3'。P53 的上游引物: 5'-ACCACCATCCACTACA ACTACA-3', P53 的下游引物: 5'-TCCCAGGACAGGCACAAAC-3'。用 1000 ng 总 RNA 为模板, 反转录获得 cDNA, 再加入相关的引物进行 PCR 反应; 以 GAPDH 为内参基因, 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值, 反映目的基因的相对表达量。实验均重复 3 次。

1.2.2 Western blot 将胶质瘤细胞转染 72 h 后, 用 RIPA 裂解液裂解细胞并提取细胞中的总蛋白, BCA 法测出蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白样品在 8% SDS-PAGE 中电泳, 随后将蛋白转至 PVDF 膜, 置入 5% 脱脂奶粉中常温封闭 1 h, 再根据说明书要求的比例稀释一抗, 在 4 °C 条件下孵育蛋白条带过夜。第 2 d 用 TBST 洗去多余的一抗, 加入 1:4 000 稀释的 HRP 标记的二抗于常温孵育 2 h, 最后用 ECL 化学发光法检测蛋白表达量。以上实验均重复 3 次。

1.2.3 免疫组织化学检测 选取合适的脑胶质瘤

组织蜡块进行连续性切片,厚度 4 μm ,并置于 68 $^{\circ}\text{C}$ 的烤箱中烘烤 25 min。石蜡经二甲苯脱蜡和不同浓度的乙醇水化后,放入 3% 过氧化氢溶液中室温静置 15 min,柠檬酸钠缓冲液高温高压抗原修复 3 min,并血清封闭。每张切片甩干多余的血清,滴加 50 μL 已稀释 RBM38 抗体(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,37.5 $^{\circ}\text{C}$ 复温 50 min,1 \times PBS 洗 3 次。随后滴加 MaxVision 二抗,室温孵育 30 min,PBS 冲洗 5 min \times 3 次;滴加新鲜配置的 DAB 显色液,显微镜下控制染色时间,苏木素核复染及返蓝后用中性树胶封片。每张切片在显微镜下随机选取 5 个视野拍照,由两名经验丰富的病理医师相互独立地依据染色强度与阳性细胞(出现棕黄色颗粒)的百分率,进行免疫组化评分(immunohistochemical scores, IHS)。染色强度分级:0,阴性;1,轻微;2,中等;3,强。阳性细胞百分率分级:1,0 ~ 25%;2,26% ~ 50%;3,51% ~ 75%;4,76% ~ 100%。切片的免疫组化评分由染色强度和阳性细胞百分率的评分乘积所得;免疫组化评分 ≥ 3 定义为高表达, < 3 定义为低表达。

1.2.4 细胞转染 特异性靶向 RBM38 的 3 条小干扰 RNA(siRNA)及阴性对照序列(命名为 si-NC)见表 1。转染前 1 d,将胶质瘤细胞接种在 6 孔板,培养至转染前细胞汇合度为 75% ~ 85%。转染前用 250 μL 不含血清的 DMEM 培养液分别稀释 Lipofectamine 2000 和 siRNA 或 si-NC,静置 5 min 后再将两者均匀混合,静置 30 min 后将混合液加入 6 孔板中,培养 4 ~ 6 h 后更换新的含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 细胞培养基,继续培养 24 ~ 48 h 后收集细胞,并提取总 RNA,用 qRT-PCR 检测 RBM38 被沉默的效率。

表 1 靶向 RBM38 的特异性小干扰 RNA 及阴性对照序列

序列名称	序列
Sima-1 sense	5'-GGAAGUACUUCGAGGGCUUTT-3'
Sima-1 antisense	5'-AAGCCCUCGAAGUACUUCCTT-3'
Sima-2 sense	5'-GCCGCAAGGCCAACGUGAATT-3'
Sima-2 antisense	5'-UUCACGUUGGCCUUGCGGCTT-3'
Sima-3 sense	5'-CCAGACGGGCUUUGCCAUTT-3'
Sima-3 antisense	5'-AAUGGCAAAGCCCUCUGGTT-3'
Si-NC sense	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
Si-NC antisense	5'-ACCUGACACGUUCGGAGAATT-3'

1.2.5 CCK-8 实验 胰酶消化处在对数生长期的肿瘤细胞并制成单细胞悬液,计数后用单细胞悬液 100 μL 、细胞以 2.5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中。分别于细胞贴壁后的 0、24、48、72 h,避光的条件下吸出原培养基后,加入细胞增殖检测试剂

(10 μL CCK-8 + 90 μL 培养基),在细胞培养箱孵育 2 h 后,用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 A_{450} ,并绘制相对应的生存曲线。实验重复 3 次。

1.2.6 划痕实验 用 100 μL ~ 1 mL 量程的枪头尖部在细胞融合度已达到 100% 的六孔板中,在直尺的辅助下划互相垂直交叉的 3 条横线和竖线,用 PBS 清洗掉划出的细胞后,放入不含血清的培养基。分别于 0 h、24 h、48 h 在倒置显微镜下观察划痕,观察同一位点的细胞迁移情况,测量划痕宽度。实验重复 3 次。

1.2.7 细胞侵袭实验 收集转染 48 h 后的胶质瘤细胞,然后采用无血清 DMEM 培养液重悬细胞。进行侵袭实验时,首先用 Matrigel 基质胶稀释液均匀包被上层小室基底,之后在上层小室加入 200 μL 细胞悬液(细胞 3.0×10^4 个),下层小室中加 700 μL 含 10% 胎牛血清的培养液,培养 18 h。培养结束后取出小室,清洗 2 次,室温下甲醇固定 20 min,0.1% 结晶紫染色 30 min,以 PBS 清洗 2 次,拭去上室内层残余细胞;在显微镜下拍照并计数。

1.2.8 细胞凋亡率检测 用流式细胞仪检测。收集六孔板中已转染 48 h 的胶质瘤细胞于 15 mL 的离心管中,加入 5 mL PBS 洗涤细胞数次,放入离心机离心 5 min(1 000 r/min)后收集细胞。小心弃去上层液体后加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5 μL Annexin V 和 5 μL Propidium Iodide 溶液,混匀后将上述悬浊液转移至专用的流式管中,室温避光的条件下静置 15 min;放入流式细胞仪中检测细胞凋亡率。

1.3 统计学方法 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。实验检测数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 t 检验。率的比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤与瘤旁正常脑组织的 RBM38 mRNA 表达水平比较 用 qRT-PCR 方法检测 6 例瘤旁正常脑组织和 19 例胶质瘤组织 RBM38 mRNA 的表达水平。结果显示,胶质瘤组织的 RBM38 mRNA 的表达水平明显高于瘤旁正常脑组织($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 胶质瘤细胞与正常胶质细胞 RBM38 mRNA 和蛋白的表达水平比较 见图 2。胶质瘤细胞 U87 和 U251 的 RBM38 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于正常胶质细胞 HA1800,差异有统计学意义(均 $P < 0.001$)。

2.3 RBM38 表达水平与临床指标的关系 见表 2。采用免疫组化检测 59 例胶质瘤的 RBM38 表达水平,阳性和阴性染色见图 3。高级别(WHO III - IV级)

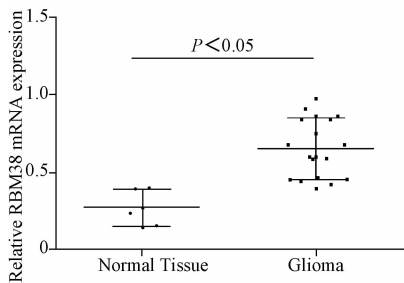


图1 胶质瘤与瘤旁正常脑组织 RBM38 mRNA 表达水平的比较

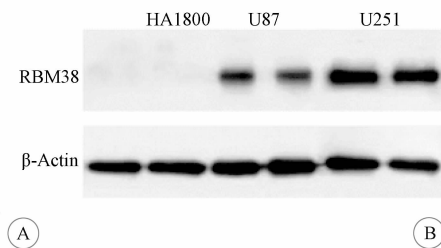
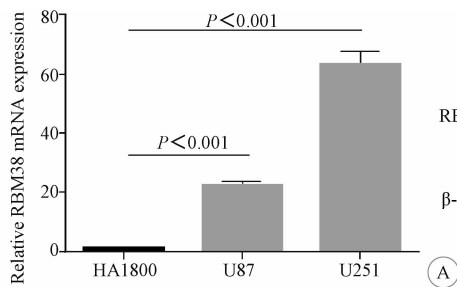


图2 胶质瘤细胞 U87、U251 与正常细胞 (HA1800) RBM38 mRNA 和蛋白的表达水平比较

胶质瘤的 RBM38 表达水平明显高于低级别 (WHO I - II 级) 胶质瘤 ($P < 0.05$), RBM38 表达水平与患者的肿瘤病理分级有关; 而与患者的年龄 ($P = 0.636$)、性别 ($P = 0.908$)、肿瘤部位 ($P = 0.823$) 和肿瘤大小 ($P = 0.859$) 均无关。

表 2 免疫组化分析 RBM38 表达量与患者临床指标的关系

临床指标	例数	RBM38 表达 (例)		P 值
		低	高	
年龄 (岁)				
≤55	32	15	17	0.636
>55	27	11	16	
性别				
男	30	13	17	0.908
女	29	13	16	
肿瘤部位				
额	19	10	9	0.823
顶	16	6	10	
枕	14	6	8	
颞	10	4	6	
肿瘤大小				
<4 cm	28	12	16	0.859
≥4 cm	31	14	17	
WHO 分级				
I - II 级	31	18	13	0.023
III - IV 级	28	8	20	

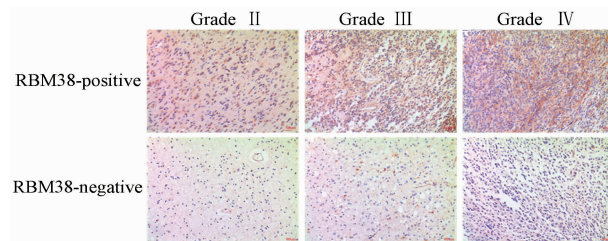


图3 不同病理级别脑胶质瘤的 RBM38 表达 (SP 染色, ×40)

2.4 RBM38-siRNA 的转染效率 转染 siRNA 的胶质瘤细胞 qRT-PCR 检测结果显示, 3 条 siRNA 序列中 siRNA-1 的干扰效果最高 (图 4)。与转染 si-NC 的细胞相比, 转染 siRNA-1 的细胞的 RBM38 mRNA 表达水平明显降低, 其中 U251 细胞下降约 67%, U87 细胞下降约 63% (均 $P < 0.05$)。用 Western blot 法验证 siRNA-1 的转染效率 (图 5), 结果相同, 差异有统计学意义。在后续实验中均采用转染 siRNA-1 序列细胞, 并命名为 si-RBM38。

2.5 转染 si-RBM38 对胶质瘤细胞迁移和侵袭能力的影响 划痕实验结果显示, 转染 si-RBM38 的胶质瘤细胞较转染 si-NC 的细胞迁移距离明显变短。在 U251 细胞中, si-RBM38 组较阴性对照组在 24 h 和 48 h 迁移距离分别下降 48% 和 54% (图 7), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Transwell 小室实验结果显示, 与转染 si-NC 相比, 转染 si-RBM38 细胞侵袭至 Transwell 下室面的细胞数明显减少, 其中 U87 细胞转染后侵袭细胞数减少约 69%, U251 细胞转染后侵袭细胞数减少约 58%, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 见图 8。表明敲除 RBM38 基因表达能显著抑制胶质瘤细胞系 U87 和 U51 的迁移和侵袭能力。

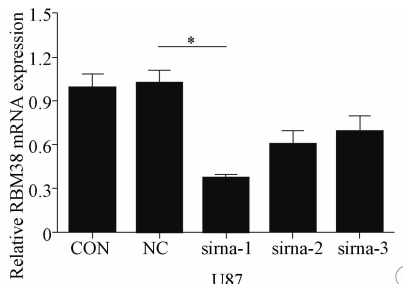
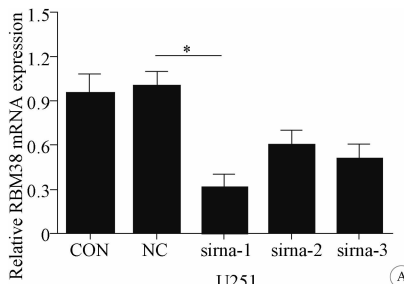


图4 转染各 siRNA 序列、si-NC 序列和空白对照 (con) 组细胞的 RBM38 mRNA 表达水平比较

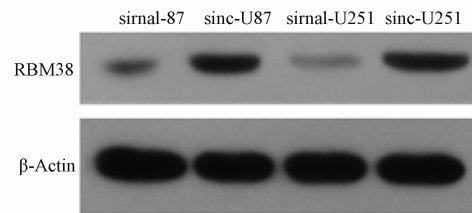
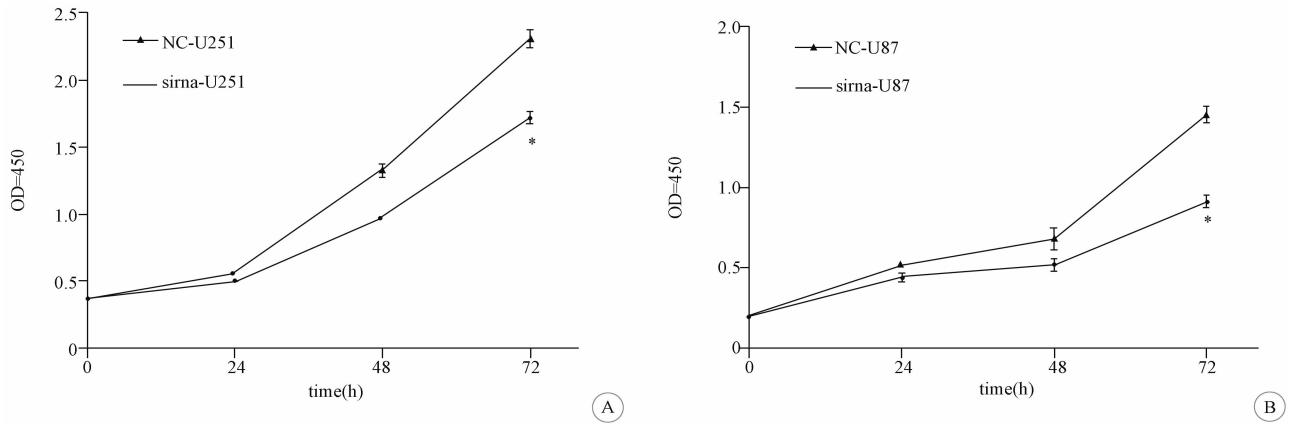
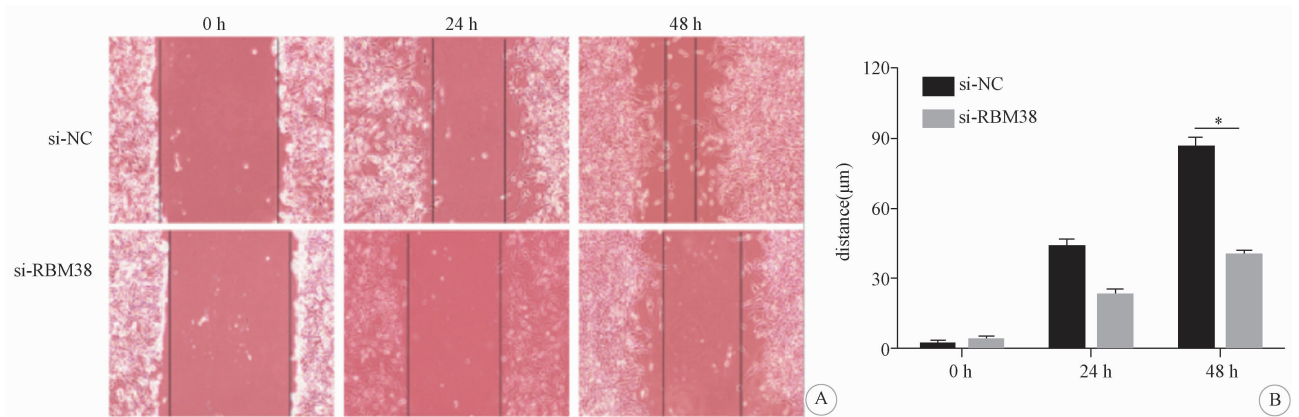


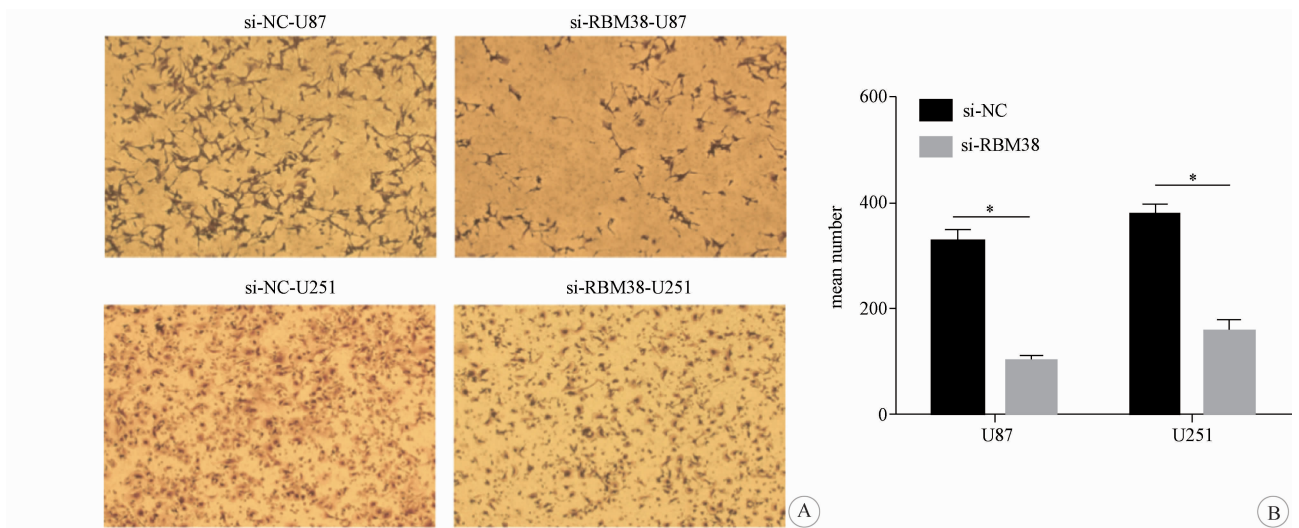
图5 siRNA-1 组与 si-NC 组 U87、U251 细胞的 RBM38 蛋白表达



A: U251 细胞; B: U87 细胞。与 si-NC 组比较 * $P < 0.05$
图 6 转染 si-RBM38 对细胞增殖活性的影响



A: 划痕实验; B: si-RBM38 组与 si-NC 组细胞迁移能力比较 (与 si-NC 组比较 * $P < 0.05$)
图 7 转染 si-RBM38 后对细胞迁移能力的影响



A: Transwell 实验; B: si-RBM38 组与 si-NC 组细胞侵袭能力比较 (与 si-NC 组比较 * $P < 0.05$)
图 8 转染 si-RBM38 后对细胞侵袭能力的影响

2.6 转染 si-RBM38 对胶质瘤细胞凋亡能力的影响
细胞流式仪测结果见图 9。转染了 si-RBM38 的肿瘤细胞较转染 si-NC 细胞的凋亡比率明显升高。在 U87 细胞中, si-RBM38 组和 si-NC 组凋亡率分别为 12.11%、5.63%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 U251 细胞中, si-RBM38 组和 si-NC 组的凋亡率

分别为 10.12%、4.79%, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明下调 RBM38 基因的表达能促进胶质瘤细胞 U87 和 U251 的凋亡。
2.7 si-RBM38 组与 si-NC 组胶质瘤细胞的 P53 mRNA 表达水平比较 见图 10。在 U87 细胞中, si-NC 组和 si-RBM38 组 P53 mRNA 的相对表达量分别为

0.92 ± 0.06、1.26 ± 0.04; 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 U251 细胞中, si-NC 组和 si-RBM38 组

P53 mRNA 的相对表达量分别为 1.37 ± 0.05、1.71 ± 0.03, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

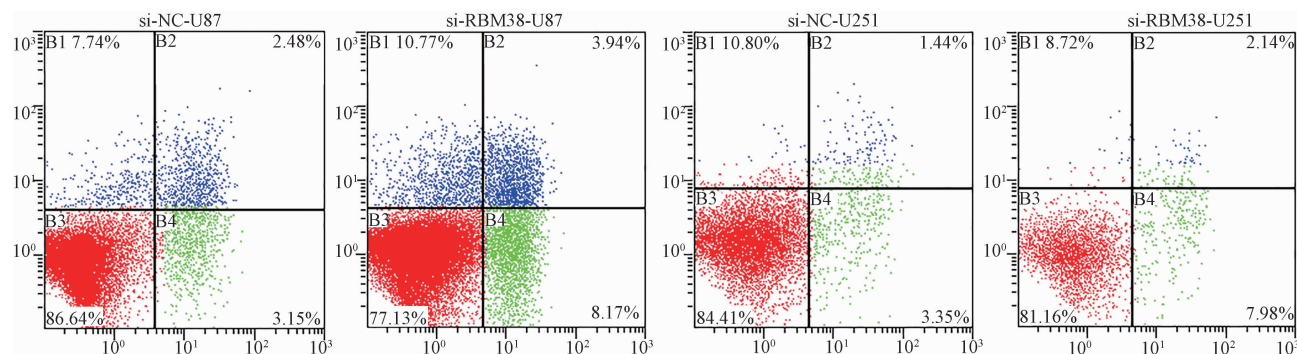


图9 流式细胞仪检测 si-RBM38 组与 si-NC 组的细胞凋亡率

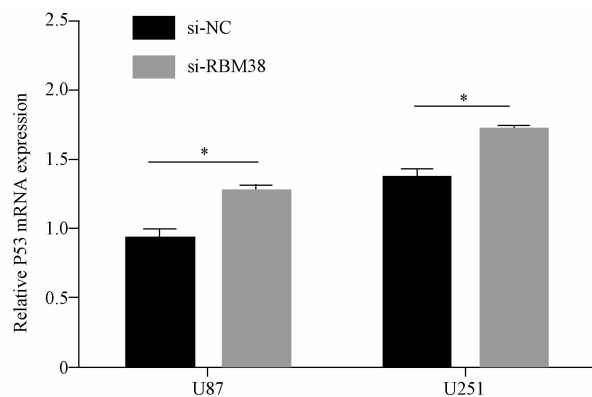


图10 si-RBM38 组与 si-NC 组 P53 mRNA 的表达水平比较 (与 si-NC 组比较 * $P < 0.05$)

3 讨论

胶质瘤是神经上皮组织来源的肿瘤,是最常见的原发性颅内肿瘤。手术切除仍是目前治疗胶质瘤的主要方法。但是对于高级别的胶质瘤,术后易复发及较低的 5 年生存率,仍是临床治疗的主要难题;尤其是胶质母细胞瘤患者,平均生存期低于 15 个月^[15-16]。随着日渐成熟的胶质瘤基因测序技术及临床实验的开展,以分子分型为基础的个体化靶向治疗逐渐得到认可。靶向治疗能精确定位肿瘤的突变基因并进行干扰,从而杀伤肿瘤细胞,抑制肿瘤的增殖和侵袭能力。为了提高靶向治疗效果,需要对胶质瘤发生发展的分子生物机制有进一步的了解^[17]。

mRNA 中所包含的顺式作用元件可以与 RBP、微小 RNA、长链非编码 RNA 等反式作用因子相互作用,进而影响 mRNA 的稳定性^[18-19]。RNA 结合蛋白可以与 RNA 结合后影响 RNA 的拼接、运输、监控、降解、翻译等生物过程。RBM38 作为 RNA 结合蛋白中的一员,也具有类似功能。RBM38 在不同的肿瘤中扮演着不同的角色:在乳腺癌和肾癌中起着抑制肿瘤的作用^[20-21],而在恶性白血病中 RBM38

存在着过度表达的现象^[22]。除此之外,还发现在敲除了 RBM38 基因的小鼠中,原发性肿瘤的发生率明显增加,且存在小鼠衰老加速的现象^[23]。RBM38 作为 P53 家族的一个靶基因,可以通过抑制 P53 基因的翻译影响肿瘤的进展。其可能的作用机制是 RBM38 通过其 C 端与 eIF4E 直接结合、N 端与 P53 mRNA 结合,从而阻止帽结合蛋白 eIF4E 与 P53 结合,进而导致 P53 翻译复合物合成受阻,最终使 P53 翻译减少^[8]。此外,RBM38 还可以通过其他途径间接影响 P53 基因的抑癌功能。RBM38 可以与 P53 基因调控的下游靶基因 MDM2 的 3'UTR 区相结合,破坏 MDM2 基因转录本的稳定性;同时 RBM38 过表达可以缩短 MDM2 转录产物的半衰期,抑制 RBM38 表达则可以延长 MDM2 产物的半衰期。这表明 RBM38 作为 P53 靶基因中的一员,同时也在 P53-MDM2 反馈循环中起着重要的作用^[24]。

为了进一步研究 RBM38 的表达升高是否影响了肿瘤细胞的发生及进展,本研究在 U87 和 U251 细胞中构建了 RBM38 敲除组,并观察沉默 RBM38 表达后对胶质瘤细胞生物学功能的影响。CCK-8 增殖实验结果显示,沉默 RBM38 表达的细胞的吸光度下降,增殖能力受到了抑制。细胞迁移和侵袭是胶质瘤转移的关键步骤,是恶性肿瘤两个最主要的生物学标志,也是高级别胶质瘤患者治疗效果差和死亡的主要原因^[25]。划痕实验和 Transwell 小室实验结果显示,沉默 RBM38 表达后,可以抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。除此之外本研究还观察到抑制了 RBM38 的表达后,胶质瘤细胞的凋亡率升高,以及 P53 mRNA 的表达水平升高。P53 是一种非常重要的抑癌因子,是细胞内多种信号转导途径的连接点,又是控制细胞增殖和凋亡的中心调解开关,能够终止细胞进程,引发细胞凋亡^[26]。P53 基因的激活导致一些抑癌基因的表达,而 P53 基因的突变和缺

失导致细胞内信号通路紊乱,细胞生长和凋亡失控,使细胞发生癌变^[27]。

综上所述,本研究结果表明胶质瘤细胞的 RBM38 高表达与肿瘤形成密切相关,证实了 RBM38 通过影响胶质瘤细胞的自身的生物学行为,如细胞的增殖、迁移、侵袭能力及凋亡,从而促进肿瘤进展。此外,RBM38 的高表达与胶质瘤的病理分级密切相关。胶质瘤组织的 RBM38 表达水平明显高于正常脑组织,并且与肿瘤的恶性程度有明显关系。本研究还发现,在胶质瘤细胞中 RBM38 可以抑制 P53 基因的表达。因此推测 RBM38 通过抑制 P53 基因的表达来调控胶质瘤细胞的恶性潜能,从而促进肿瘤的发生发展。但是 RBM38 在胶质瘤细胞中具体如何作用于 P53 基因,进而影响 P53 基因的表达,还需要进一步研究。RBM38 是否能够调控其他信号通路从而影响胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等生物学行为,仍有待进一步研究。今后更深入地探讨 RBM38 在胶质瘤诊断和治疗中的应用价值,可为胶质瘤的分子治疗提供新的方向。

[参 考 文 献]

- [1] Mitchell SF, Parker R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs[J]. *Mol Cell*,2014,54:547.
- [2] Singh G,Pratt G,Yeo GW, *et al.* The clothes make the mRNA: past and present trends in mRNP fashion [J]. *Annu Rev Biochem*, 2015,84:325.
- [3] Shu L, Yan W, Chen X. RNP1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, is required for maintaining the stability of the basal and stress-induced p21 transcript [J]. *Genes Dev*,2006, 20:2961.
- [4] Cho SJ,Teng IF,Zhang M, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 alpha is regulated by RBM38, a RNA-binding protein and a p53 family target, via mRNA translation [J]. *Oncotarget*,2015,6:305.
- [5] Zhang YH,Feng XL,Sun WQ, *et al.* Serine 195 phosphorylation in the RNA-binding protein Rbm38 increases p63 expression by modulating Rbm38's interaction with the Ago2-miR203 complex [J]. *J Biol Chem*,2019,294:2449.
- [6] Cho SJ, Zhang J, Chen X. RNP1 modulates the RNA-binding activity of, and cooperates with, HuR to regulate p21 mRNA stability [J]. *Nucleic Acids Res*,2010,38:2256.
- [7] Yin T,Cho SJ,Chen XB. RNP1, an RNA-binding Protein and a p53 Target, Regulates macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) expression through mRNA stability [J]. *J Biol Chem*,2013,288:23680.
- [8] Zhang J, Cho SJ, Shu L, *et al.* Translational repression of p53 by RNP1, a p53 target overexpressed in lymphomas [J]. *Genes Dev*, 2011,25:1528.
- [9] Hotte GJ, Linam-Lennon N, Reynolds JV. Radiation sensitivity of esophageal adenocarcinoma: the contribution of the RNA-Binding protein RNP1 and p21-Mediated cell cycle arrest to radioresistance [J]. *Radiat Res*,2012,177:272.
- [10] Bar-Shira A, Pinthus JH, Rozovsky U, *et al.* Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft [J]. *Cancer Res*,2002,62:6803.
- [11] Xue JQ, Xia TS, Liang XQ, *et al.* RNA-binding protein RNP1: acting as a tumor suppressor in breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2014,14:322.
- [12] Wampfler J, Federzoni EA, Torbett BE, *et al.* The RNA binding proteins RBM38 and DND1 are repressed in AML and have a novel function in APL differentiation [J]. *Leuk Res*,2016,41:96.
- [13] Yang LM,Zhang Y,Ling CH, *et al.* RNP1 inhibits non-small cell lung cancer progression via regulating miR-181a/CASC2 axis [J]. *Biotechnol Lett*,2018,40:543.
- [14] Ding ZM, Yang HW, Xia TS, *et al.* Integrative genomic analyses of the RNA-binding protein, RNP1, and its potential role in cancer prediction [J]. *Int J Mol Med*,2015,36:473.
- [15] Rasmussen BK, Hansen S, Laursen RJ, *et al.* Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I - IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry [J]. *J Neurooncol*,2017,135:571.
- [16] Batash R, Asna N, Schaffer P, *et al.* Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review [J]. *Curr Med Chem*,2017,24:3002.
- [17] 常骏,潘先文. 胶质瘤基因治疗进展 [J]. *临床神经外科杂志*, 2012,9:184.
- [18] Wei, Chen, Qi, *et al.* Alternative polyadenylation: methods, findings, and impacts [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2017,15:287.
- [19] Ghosh S, Jacobson A. RNA decay modulates gene expression and controls its fidelity [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*,2010,1:351.
- [20] Zhou XJ, Wu J, Shi L, *et al.* PTEN expression is upregulated by a RNA-binding protein RBM38 via enhancing its mRNA stability in breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2017,36:149.
- [21] Huang W, Wei XL, Ni WW, *et al.* The expression of RNA-binding protein RBM38 decreased in renal cell carcinoma and represses renal cancer cell proliferation, migration, and invasion [J]. *Tumor Biol*,2017,39:1393388029.
- [22] 唐青青,陆伟,张海健,等. 白血病中 RNA 结合蛋白 RNP1 的表达及意义 [J]. *中华临床医师杂志:电子版*,2014,8:830.
- [23] Zhang J, Xu ES, Ren C, *et al.* Mice deficient in Rbm38, a target of the p53 family, are susceptible to accelerated aging and spontaneous tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2014,111:18637.
- [24] Ye JZ, Liang R, Bai T, *et al.* RBM38 plays a tumor-suppressor role via stabilizing the p53-mdm2 loop function in hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2018,37:212.
- [25] 杨学军,海龙,于圣平. 恶性胶质瘤侵袭迁移的生物学行为研究 [J]. *中国现代神经疾病杂志*,2018,18:1.
- [26] Munoz-Fontela C, Mandinova A, Aaronson SA. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation [J]. *Nat Rev Immunol*,2016,16:741.
- [27] Li XL, Zhou JB, Chen ZR, *et al.* p53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation [J]. *World J Gastroenterol*,2015,21:84.

(收稿 2018-12-20 修回 2019-02-11)