

RBMX在食管鳞状细胞癌中的相关性研究

——RBMX对食管鳞状细胞癌细胞增殖和凋亡的影响

刘芳^{1,2,3}, 李贵才^{1,2}, 丁宗梅⁴, 秦凯⁵, 陆松华^{5*}

¹南通大学, 江苏省神经再生教育部重点实验室, 江苏 南通

²南通大学, 神经再生协同创新中心, 江苏 南通

³南通大学, 医学院, 江苏 南通

⁴苏北人民医院, 病理科, 江苏 扬州

⁵南通大学附属海安医院, 胸外科, 江苏 海安

Email: liufnt@163.com, gcli1981@ntu.edu.cn, zonghappy@126.com, 329612148@qq.com,

*stshsc366@sohu.com

收稿日期: 2021年7月16日; 录用日期: 2021年8月26日; 发布日期: 2021年9月3日

摘要

RBMX (也称为hnRNP G)是hnRNP家族的成员, 最早被鉴定为表观分子量为43 kDa的核蛋白。本研究目的是检验RBMX在ESCC中是否是肿瘤抑制因子的假设。对食管鳞状细胞癌组织进行免疫组织化学和蛋白质印迹分析。采用Kaplan-Meier法来分析ESCC患者的生存率。通过构建RBMX的过表达质粒, 研究了RBMX在TE1食管鳞状细胞癌细胞系增殖中的作用。通过CCK-8和流式细胞术测定RBMX对增殖和凋亡的调节。免疫组化分析显示RBMX表达与Ki67呈负相关。生存分析显示RBMX表达与总体生存率显著相关($P < 0.001$)。RBMX在TE1细胞中的过表达可导致CyclinD1 (细胞周期蛋白D1)、CDK4和p27水平降低和细胞增殖能力的下降。此外, RBMX的过表达可以诱导TE1细胞凋亡。这些发现表明RBMX参与了食管鳞状细胞癌的增殖, 并且RBMX表达水平的升高可能表示食管鳞状细胞癌患者的良好预后。

关键词

食管鳞状细胞癌, RBMX, 细胞增殖, 细胞凋亡

Study on the Correlation of RBMX in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

—Effects of RBMX on the Proliferation and Apoptosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma

*通讯作者。

Fang Liu^{1,2,3}, Guicai Li^{1,2}, Zongmei Ding⁴, Kai Qin⁵, Songhua Lu^{5*}

¹Key Laboratory of Neuroregeneration of Jiangsu and Ministry of Education, Nantong University, Nantong Jiangsu

²Co-Innovation Center of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong Jiangsu

³School of Medicine, Nantong University, Nantong Jiangsu

⁴Department of Pathology, Northern Jiangsu People's Hospital; Yangzhou Jiangsu

⁵Department of Thoracic Surgery, The Affiliated Hai'an Hospital of Nantong University, Hai'an Jiangsu

Email: liufnt@163.com, gcli1981@ntu.edu.cn, zonghappy@126.com, 329612148@qq.com,

*stshsc366@sohu.com

Received: Jul. 16th, 2021; accepted: Aug. 26th, 2021; published: Sep. 3rd, 2021

Abstract

RBMX (also known as hnRNP G), is a member of hnRNP family and was first identified as a nuclear protein with an apparent molecular weight of 43 kDa. The current study was designed to test the hypothesis that RBMX is a tumor suppressor. Immunohistochemical and western blot analyses were performed in esophageal squamous cell carcinoma tissues. Survival analyses were performed by using the Kaplan-Meier method. The role of RBMX in proliferation was studied in esophageal squamous cell carcinoma cell lines of TE1 by constructing the RBMX overexpression plasmid. The regulation of RBMX on proliferation and apoptosis was determined by Cell Counting Kit-8 assays and Flow Cytometry. Immunohistochemical analysis showed that RBMX expression was negatively associated with Ki67. Survival analysis revealed that RBMX expression was significantly associated with overall survival ($P < 0.001$). Over-expression of RBMX in TE1 cells resulted in decreased CyclinD1, CDK4 and p27 levels and the capability for proliferation. In addition, over-expression of RBMX induces the Apoptosis of TE1 cells. These findings suggest that RBMX is involved in the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma, and that elevated levels of RBMX expression may indicate a good prognosis for patients with esophageal squamous cell carcinoma.

Keywords

Esophageal Squamous Cell Carcinoma, RBMX, Cell Proliferation, Cell Apoptosis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

食管癌是世界上第八大常见癌症，也是第六大癌症死亡原因[1]。食管鳞状细胞癌(ESCC)是主要的组织学亚型，占有食管癌病例的95%以上[2]。由于预后不良和高死亡率，ESCC被认为是最具侵袭性的恶性肿瘤之一[3]。ESCC病患者通常表现为局部晚期，这对于传统的治疗方法来说是难以治愈的[4]。食管癌的研究取得了许多突破，手术仍然是这种恶性肿瘤的最佳治疗选择[5]。虽然食管癌的临床诊断和治疗技术在不断更新进步[6][7]，但ESCC病患者的预后仍然很差，5年生存率仅为15%至25%[8]。因此，生物标志物的鉴定和食管癌相关分子机制的研究对于改善ESCC患者的预后非常重要，有助于我们对食管癌发病机制的理解。

RNA 结合蛋白(RBPs)似乎在基因表达调控中起着重要作用, 已知其生物学功能是参与 mRNA 前剪接和转录后调控机制[9]。RBMX (又称 hnRNP G)是 hnRNP 家族的成员, 最早被鉴定为表观分子量为 43 kDa 的核蛋白[10] [11]。RBMX 被鉴定为 Y 染色体链基因 RBMY 的附属同源物, 其负责精子发生[11] [12], 并与肝癌的进展有关[13]。它在几乎所有器官中的表达无处不在, 表明 RBMX 在各种细胞的过程中具有基本功能。据报道, RBMX 是人类口腔鳞状细胞癌中的肿瘤抑制剂[14], 部分通过增强已知的肿瘤抑制剂硫多辛相互作用蛋白基因来诱导人癌细胞的肿瘤抑制活性[15]。无处不在的 RBM 蛋白已被鉴定为一个新的 RNA 结合凋亡调节剂家族[16]。在乳腺癌中, 所有 X 染色体 RBM 基因的表达与凋亡 Bax 基因的表达显著相关[17]。此外, 它还发现乳腺癌中 RBMX 和 CD105, 血管内皮生长因子呈显著负相关[18]。

2. 材料与方方法

2.1. 患者和组织样本

本实验选用食管鳞状细胞癌石蜡标本 87 例购买自上海芯超生物科技有限公司, 为 2009.1 至 2010.12 期间手术切除的标本, 随访期 4.6~6.5 年, 病理诊断结果确定, 有临床相关完整的病理相关资料。蛋白的提取的新鲜食管鳞状细胞癌组织与此组织相关癌旁组织标本 6 例, 均由南通大学附属医院提供, 体内切除 0.5 h 内转移入低温冰箱(-80℃)存储。患者的主要临床和病理特征, 包括年龄、性别、肿瘤分级、转移、肿瘤大小和浸润情况, 见表 1。标本根据国际抗癌联盟的 TNM 分类系统进行分类。患者以男性居多, 占 60.92%。肿瘤分为“良好”(n = 23)、“中度”(n = 32)或“差”(n = 32)分化。随访时间为 5 年, 范围为 1~56 个月(中位数 = 37 个月)。所有 87 名患者均获得知情同意。

Table 1. RBMX, Ki67 expression and clinicopathological parameters in 87 ESCC specimens

表 1. 87 例 ESCC 标本临床病理参数, RBMX 和 KI67 之间的表达

Parameters	Total	RBMX		P	Ki67		P
		Low	High		Low	High	
Age (years)							
≤65	41	26	15	0.822	16	25	0.509
>65	46	31	15		17	29	
Gender							
Male	53	37	16	0.357	19	34	0.656
Female	34	20	14		14	20	
Histological grade							
Well	23	6	17	0.000*	18	5	0.000*
Mod	32	22	10		11	21	
Poor	32	29	3		4	28	
Metastasis							
Positive	57	23	7	0.155	24	33	0.354
Negative	30	34	23		9	21	
Tumor size (cm)							
≤5	29	26	3	0.004*	6	23	0.021*
>5	58	31	27		27	31	

Continued

Tumor invasion (T)							
T1	15	9	6	0.884	6	9	0.866
T2	15	11	4		5	10	
T3	39	25	14		16	23	
T4	18	12	6		6	12	

NOTE: Statistical analyses were performed by the Pearson χ^2 test. * $P < 0.05$ was considered significant.

2.2. 细胞培养

人 ESCC 细胞系 TE-1 购自中国医学科学院(上海, 中国)。细胞在补充有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 中于 37°C 在含有 5% CO₂ 的湿化培养箱中培养。

2.3. 蛋白质印迹分析

组织或细胞在冷的 RIPA 缓冲液中裂解(Beyotime Biotechnology, China)。使用布拉德福蛋白质测定试剂盒((Bio-Rad, Hercules, CA, USA)测定蛋白质浓度。将等量的蛋白质加样在 10% 的 SDS-PAGE 上。然后将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。然后将膜封闭在 5% 的无脂牛奶中,随后在 4°C 下与针对 RBMX、PCNA、Cyclin D1、CDK4、p27、p53、Casase-8、Bax、Bcl2 和 β -actin 的一抗一起孵育过夜(Cell Signaling Technology, USA)。用 PBST 洗涤三次后,将膜与合适的二抗一起孵育。使用增强化学发光试剂检测蛋白质(Beyotime Biotechnology, China)。使用图像软件(ImageJ)测量蛋白质密度。

2.4. CCK-8 测定

使用 CCK-8 (cell counting Kit-8)测定法测定细胞增殖。简而言之,细胞以 2×10^4 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板上,并在 37°C 和 5% CO₂ 下培养箱过夜。在指定的时间向每个孔中加入 CCK-8 试剂(Beyotime Biotechnology),细胞进一步培养 4 小时。使用微孔板读数器读取 490 纳米处的吸光度。

2.5. 免疫组织化学

将组织切片(1 μ m)切割,置于 APES 预处理的载玻片上,脱蜡,通过分级酒精再水合,并在 3% 过氧化氢中淬灭。抗原回收通过在 10 mM 柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)中以高功率(750 瓦)微波加热进行,每循环 5 分钟。冷却至室温下用正常血清封闭 2 h 后,切片与抗人 RBMX 及 Ki-67 兔多克隆抗体(稀释 1:150;美国 Abcam)。为评估 RBMX 及 Ki-67,随机选择了五个高倍镜视野。每场计数超过 500 个细胞。通过阳性染色肿瘤细胞的百分比和染色强度来确定两个观察者。RBMX 及 Ki-67 阳性百分比评分如下: 0 (5% 阳性肿瘤细胞); 1 (5%~30% 阳性肿瘤细胞); 2 (30%~60% 阳性肿瘤细胞); 3 (>60% 阳性肿瘤细胞)。染色强度分级如下: 0 (阴性)、1 (弱)、2 (中等)和 3 (强)。免疫染色分数计算为阳性分数 4 染色强度分数的百分比,范围从 0 分到 9 分。0 分被认为是负数; 1~3 分被认为是弱表达; 4~6 分被认为是中等表达; 7~9 分被认为是强表达。对于统计分析, 0~3 被视为低表达组,而 7~9 被视为过表达组。

2.6. 质粒构建和转染

购自 GENECHM (中国上海)合成的 RBMX 的过表达质粒, cDNA 靶向序列: RBMX, 正义链 = 5-GAGGA tccccgggtaccgcccacca tggcggccgacggc-3 和反义链 = 5-TCACCA tggcggcaccgggctgacactaactgagcca-3; 和阴性对照(NC), 正义链 = 5uucuccgaacguguccgudtdt-3, 反义链 = 5-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3。根据制造商的说明,用超高效蛋白进行细胞转染。

2.7. 细胞周期分析和细胞凋亡分析

通过流式细胞术分析了 RBMX 对 TE1 细胞周期的影响。转染的细胞在预冷的 PBS 中洗涤，并重新悬浮在 5 ml 70% 乙醇中，然后固定过夜。然后收集乙醇悬浮的细胞，洗涤，用含 250 毫克核糖核酸酶 A 的 50 毫克/毫升碘化丙锭在室温下黑暗中染色 30 分钟，随后用流式细胞仪和细胞探索软件进行分析。

根据商品说明书，使用 PEAnnexin V 凋亡检测试剂盒，过流式细胞仪分析来测量细胞的凋亡(BD Biosciences, CA, USA)。简而言之，用 RBMX 过度表达或 NC 转染 48 小时后收集 1×10^5 TE1 细胞在室温下以 3000 转离心 5 分钟。细胞在冷的 PBS 中洗涤一次，轻轻重新悬浮在 100 毫升结合缓冲液中，并在室温下与 Annexin V-PE 和 7AAD 在黑暗中孵育 15 分钟。然后向细胞悬浮液中加入 400 ml 结合缓冲液，使用流式细胞仪软件进行分析。

2.8. 统计分析

通过 PASW18 统计软件进行统计分析。采用 χ^2 检验分析 Ki-67 和 RBMX 表达与临床病理特征的关系。使用 Kaplan-Meier 方法构建总生存曲线，并使用对数秩检验评估差异的统计学意义，差异显著($P < 0.05$)。

3. 研究结果

3.1. RBMX 在 ESCC 的表达及其与临床病理资料的相关性

为了确定 RBMX 的表达水平与 ESCC 之间的相关性，我们使用免疫组织化学染色来检测 87 例 ESCC 样本中 RBMX 和 Ki67 的表达。免疫组织化学(IHC)结果如图 1 所示。发现 RBMX 的免疫反应定位于肿瘤细胞核和胞浆，在高分化 ESCC 组织中高表达，在低分化 ESCC 组织中低表达。临床病理参数、RBMX 和 Ki67 表达之间的关系见表 1。分析结果表明，RBMX 在 ESCC 的表达与组织学分级($P < 0.001$)、肿瘤大小($P = 0.002$)和淋巴结转移显著相关，而与年龄、性别和侵袭性无关。此外，在所有 ESCC 病例中，RBMX 的表达与 Ki67 的表达呈负相关。基于增殖活性发现 RBMX 表达与 ki-67 呈负相关($P < 0.01$, 图 2)。

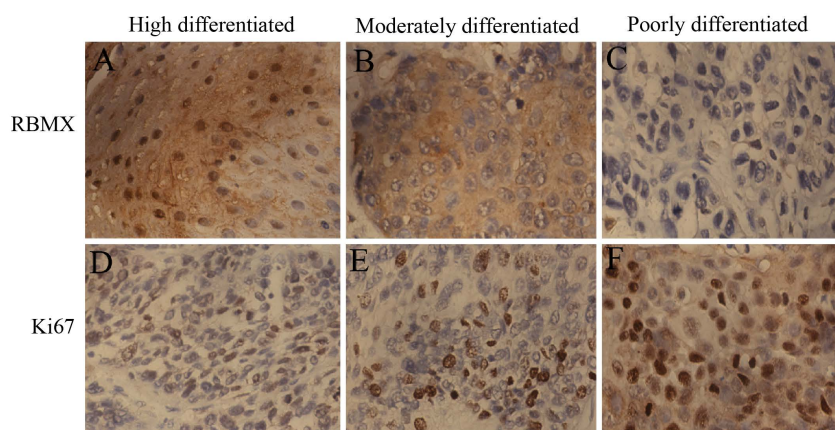


Figure 1. Immunohistochemical staining reveals of RBMX and KI67 in tissue sections. (A) and (D) showed RBMX and KI67 staining in ESCC with well differentiated histological grade. (B) and (E) showed RBMX and KI67 staining in ESCC with moderately differentiated histological grade. (C) and (F) showed RBMX staining in ESCC with poorly differentiated histological grade. (400× magnification)

图 1. RBMX 和 KI67 在组织切片中的免疫组织化学染色。(A)和(D)显示 RBMX 和 KI67 在组织学分级分化良好的组织中的染色。(B)和(E)显示 RBMX 和 KI67 在组织学分级中等分化组织中的染色。(C)和(F)显示 RBMX 在组织学分级低分化组织中的染色(放大 400 倍)

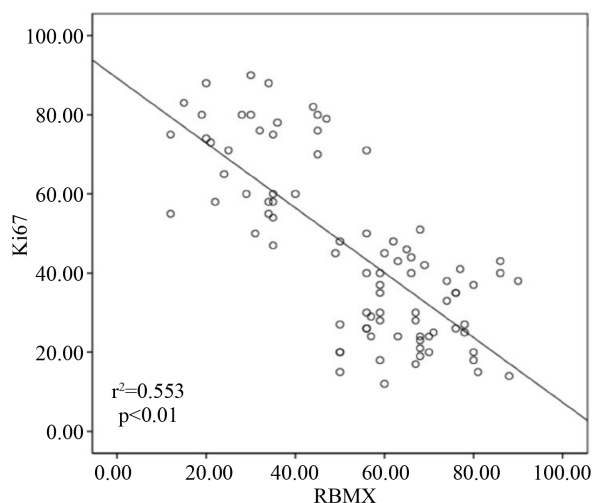


Figure 2. Relationship between Ki-67 and RBMX expression in ESCC. The correlation between the scatter plot of ki-67 and RBMX and the Spearman correlation coefficient was shown by the regression line ($P < 0.01$)

图 2. 在 ESCC 中 Ki-67 与 RBMX 的表达关系。ki-67 和 RBMX 的散点图与 Spearman 相关系数之间的相关性用回归线表示($P < 0.01$)

3.2. RBMX 在 ESCC 组织中表达下调

为了验证免疫组织化学结果的特异性,使用蛋白质印迹分析 6 对新鲜的 ESCC 组织。以 β -actin 作为对照,通过光度测定定量 RBMX 的表达。免疫印迹分析检测 RBMX 和 PCNA 的表达,结果与免疫组化一致。在这些情况下,ESCC 组织中 RBMX 的表达水平明显低于邻近的非肿瘤组织(图 3)。

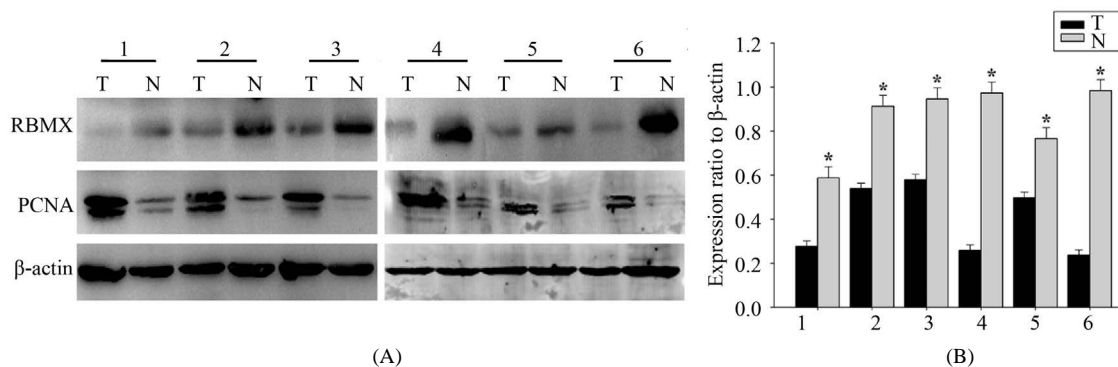


Figure 3. Expression of RBMX in human ESCC. (A) Expression of RBMX in six representative paired samples of esophageal tumor tissues (T) and adjacent non-tumorous tissues (N); (B) The bar chart demonstrates the ratio of RBMX protein to β -actin for the above by densitometry. The data are mean \pm SEM ($*P < 0.01$, compared with adjacent non-tumorous tissues)

图 3. 在 ESCC 组织中 RBMX 的表达。(A) RBMX 在 6 个有代表性的食管肿瘤组织和邻近非肿瘤组织配对样本中的表达。(B) 条形图通过光度测定定量显示了上述的 RBMX 蛋白与 β -actin 的比例。(与邻近非肿瘤组织相比, $P < 0.01$)

3.3. 在 ESCC 病例中 RBMX 的表达与生存率的关系

生存分析仅限于 87 例病例,获得了完整的随访数据和 RBMX 表达结果。通过使用高水平 and 低水平

的 RBMX 评估 RBMX 对 ESCC 患者的总生存期的预后价值。Kaplan-Meier 分析显示, RBMX 低表达与总生存期短有相关性($P < 0.01$, 图 4)。使用多变量 Cox 比例风险模型分析表明, RBMX 蛋白可以作为 ESCC 患者总生存期的一个独立预后指标($P = 0.001$, 表 2)。

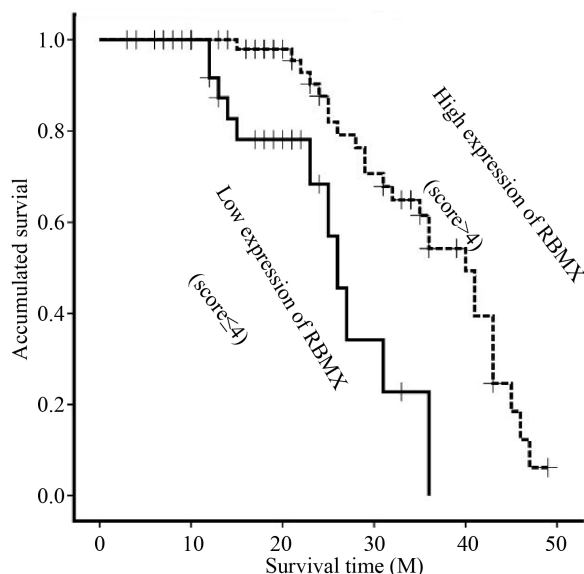


Figure 4. According to the cumulative survival curve expressed by RBMX. On the basis of RBMX scores, patients were classified as high RBMX expressers (score ≥ 4) and low RBMX expressers (score < 4). The overall survival of patients with lower expression RBMX group was obviously reduced **图 4.** 根据 RBMX 表达的总生存率存活曲线。根据 RBMX 评分, 将患者分为高 RBMX 表达者(评分 ≥ 4)和低 RBMX 表达者(评分 < 4)。低表达 RBMX 组患者的总生存率明显降低

Table 2. Contribution of various potential prognostic factors to survival by Cox regression analysis in 87 specimens
表 2. Cox 回归分析 87 个样本中各种潜在的影响预后的因素

	Relative ratio	95% Confidence interval	P
Age (years)	1.117	0.570~1.190	0.747
Gender	0.726	0.370~1.426	0.353
Histological grade	1.711	1.005~2.915	0.048*
Metastasis	1.218	0.615~2.414	0.571
Tumor size (cm)	2.041	0.997~4.177	0.051
Tumor invasion (T)	1.105	0.782~1.563	0.547
RBMX	0.260	0.116~0.581	0.001*
Ki67	2.123	1.011~4.461	0.047*

NOTE: Statistical analyses were performed by the Cox test analysis; * $P < 0.05$ was considered significant.

3.4. RBMX 的过表达抑制 ESCC 细胞增殖

为了探索 RBMX 对 ESCC 的潜在影响, 我们通过转染 pcdnagv 144 CMV-EGFP-MCS-SV40-新霉素表达载体增加了 RBMX 在 TE1 细胞中的表达。通过蛋白质印迹分析验证了转染子后 TE1 细胞中 RBMX 的有效表达(图 5(A)和图 5(B))。接下来研究 RBMX 的过表达对 ESCC 细胞增殖的影响。CCK-8 分析显示

RBMX 过度表达显著降低了 TE1 细胞的增殖能力(图 5(C))。进一步分析 RBMX 过度表达后对细胞周期相关蛋白的影响,发现 RBMX 过表达后可下调 CyclinD1、CDK4 和 p27 的表达(图 5(F))。我们发现,在 RBMX 过表达的细胞中,G1 期的百分比(阴性对照组为 51.66%,RBMX 过表达组为 71.29%)增加,S 期百分比(阴性对照组为 32.64%,RBMX 过表达组为 16.53%)降低(图 5(D))。此外,G2 期细胞百分比降低(阴性对照组为 15.70%,RBMX 过表达组为 12.18%)。这些结果表明 RBMX 的过度表达可能阻滞细胞周期的 G1/S 期。

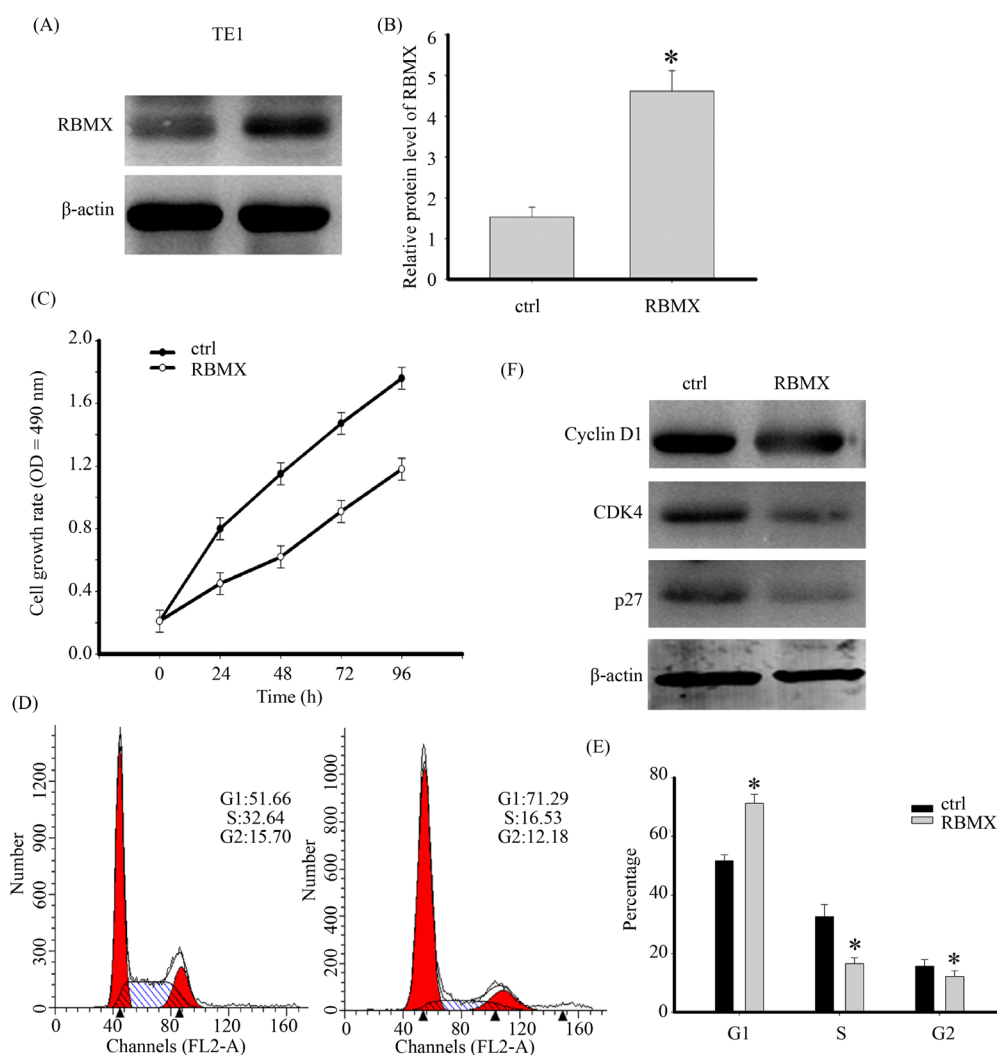


Figure 5. Over-expression of RBMX reduces cell proliferation. (A) and (B) RBMX protein expression detected by Western blot 48 h after over-expression plasmid transfection of TE1 cells; (C) CCK-8 assay suggested that cell proliferation of TE1 after RBMX over-expression was reduced compared with the control group; (D) and (E) Cell cycle analyses showed that the percentage of G1 phase was increased in over-expression RBMX group ($P < 0.05$), whereas the percentages of S phase ($P < 0.05$) and G2 phase ($P < 0.05$) were decreased in the RBMX over-expression in cells compared with control cells; (F) Western blotting analysis of the cell-cycle related proteins showed the expression of Cyclin D1 and CDK4 and p27 were decreased after over-expression RBMX in TE1 cells

图 5. RBMX 过度表达降低细胞增殖。(A)和(B)过表达质粒转染 TE1 细胞 48 h 后通过蛋白质印迹检测 RBMX 蛋白表达; (C) CCK-8 检测提示 RBMX 过度表达后 TE1 细胞增殖较对照组减少; (D)和(E)细胞周期分析显示,在 RBMX 过表达组中 G1 期的百分比增加($P < 0.05$),而在 RBMX 过表达细胞中 S 期($P < 0.05$)和 G2 期($P < 0.05$)的百分比与对照细胞相比降低; (F) 细胞周期相关蛋白的蛋白质印迹分析显示 Cyclin D1 和 CDK4 和 p27 在 TE1 细胞中过度表达后表达降低

3.5. RBMX 过表达可诱导 TE1 细胞的凋亡

由于 RBMX 蛋白是一种新的 p53 靶基因产物,它在 DNA 双链断裂修复的保真度中起重要作用[19],如上所述,我们检测了 p53 在表达野生型 p53 的 TE1 细胞系中的表达。RBMX 过表达质粒转染后 48 小时, RBMX 蛋白表达水平显著提高。蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白。结果显示, RBMX 过表达增加了 p53、Bax 和 caspase-8 的蛋白水平,降低了 Bcl-2 的表达(图 6(A)和图 6(B))。此外, Annexin V 分析被用来检测 RBMX 的过表达可以诱导 TE1 细胞凋亡。显然,在 RBMX 过表达的细胞中,与对照相比,在细胞中可以观察到较低细胞的早期和晚期凋亡(5.67%至 3.4%,和 0.29%至 0.21%,所有 $P \leq 0.05$) (图 6(C))。这提示 RBMX 过表达可以诱导 p53 依赖性的食管癌细胞的凋亡。

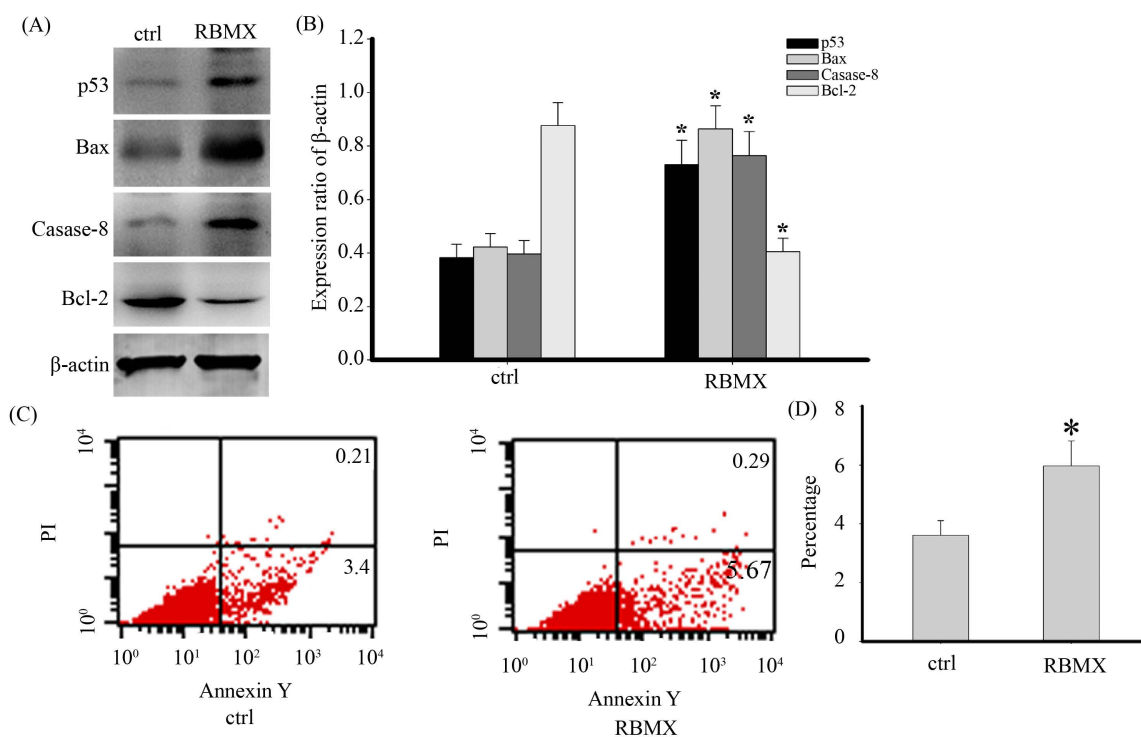


Figure 6. RBMX over-expression induces apoptosis in TE1. (A) and (B) Western blotting analysis of the cell-apoptosis related proteins showed the expression of p53, Bax, and Caspase-8 were increased, and Bcl-2 was decreased after over-expression RBMX in TE1 cells; (C) and (D) RBMX over-expression induced apoptosis in TE1 cell line ($P < 0.05$)

图 6. RBMX 过表达可诱导 TE1 细胞凋亡。(A)和(B) 蛋白质印迹分析显示细胞凋亡的相关蛋白,在 TE1 细胞中过表达 RBMX 后, p53、Bax 和 Caspase-8 的表达增加,而 Bcl-2 的表达降低;(C)和(D) RBMX 过度表达诱导 TE1 细胞凋亡($P < 0.05$)

4. 讨论与展望

研究表明, RBMX 的表达在人类口腔癌和口腔鳞状细胞癌中具有肿瘤抑制的活性[14] [20]。然而,在 ESCC 中 RBMX 表达的,以及在 ESCC 中 RBMX 表达与临床病理因素之间的关系还没有被确定。在我们的研究中,我们首次报道了 RBMX 对 ESCC 细胞生长的抑制作用。ESCC 的细胞和组织显示 RBMX 的异常表达。这首先通过免疫组织化学得到证实,其显示 ESCC 组织中 RBMX 蛋白的水平与 ESCC 组织的分化等级有相关性。RBMX 表达的下调与分化($P = 0.000$)和肿瘤大小($P = 0.004$)有相关性。RBMX 表达下调的患者组织分化差,肿瘤体积大,无瘤生存期短。这些结果表明, RBMX 可能在人类 ESCC 进程中发挥重要作用。由于大多数抑制剂可以通过影响细胞周期进程来影响细胞生长,因此使用细胞周期分析

和 cck-8 分析来研究 RBMX 在细胞增殖中的作用。结果表明, RBMX 过表达组的 G1 期比例要高于对照组, S 期和 G2 期比例低于对照组。与对照组相比, RBMX 过表达后 TE1 细胞的增殖下调, 提示 RBMX 可能抑制 TE1 细胞的增殖。蛋白质印迹检测细胞周期蛋白相关蛋白的表达, 包括 Cyclin D1、CDK4 和 p27。Cyclin D1 和 CDK4 也可产生复杂的磷酸化 Rb, 这是通过控制 G1 相限制点来调节细胞增殖的一个关键因素[21]。Cyclin D1 过度表达已在许多癌症中观察到, 并已被证明与癌细胞增殖有关[22] [23] [24]。我们发现细胞中过表达 RBMX 后, Cyclin D1 和 CDK4 表达水平降低, 这与 G1 百分比增加和 S 和 G2 减少有关。因此, 我们猜测 RBMX 可能是控制了 ESCC 细胞周期的关键调节因子。

先前的研究表明 RBMX 是 RBM 蛋白的一员, 据报道它是一个新的凋亡调节剂家族[16] [18]。RBMX 蛋白是一种新的 p53 靶基因产物[19]。所有 X 染色体 RBM 基因的表达与人乳腺癌中促凋亡基因 Bax 的表达显著相关[18]。为了证实 RBMX 在人类 ESCC 发展中的潜在作用, 我们构建了 RBMX 过表达的质粒, 并转染了表达野生型 p53 的 TE1 细胞, 以供进一步研究。首先, 我们通过蛋白质印迹检测了凋亡相关蛋白如 p53、Bcl-2、Bax 和 Caspase-8 的表达, 发现过表达 RBMX 后可以上调 p53、Bax 和 Caspase-8 的表达, 下调 Bcl-2 的表达。我们还使用 Annexin V 试剂盒检测了 TE1 细胞过表达 RBMX 后对细胞凋亡的影响。我们的结果表明, 与流式细胞术检测的细胞凋亡阴性对照组相比, RBMX 过表达的细胞凋亡群体显著增加(分别为 5.67% 和 3.4%, $P < 0.05$)。野生型 p53 在细胞周期、分化和凋亡中也起着重要作用[25]。上述结果可能解释了 RBMX 对人 ESCC 细胞分化的作用机制。总之, 本研究检测了 RBMX 在人食管鳞状细胞癌中的表达及其临床病理学意义。组织中 RBMX 的测定有望以后可用于人类食管鳞状细胞癌发生的早期诊断。

基金项目

国家自然科学基金 (31830028, 31771054), 江苏省教育厅自然科学重点科研项目(19KJA320006), 江苏省卫计委 2015 年度医改试点单位科研课题(编号: YG2015), 扬州市十三五科教强卫重点人才(编号: RCC201857)。

参考文献

- [1] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., *et al.* (2015) Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, **136**, E359-E386. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1002/ijc.29210?download=true> <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- [2] Fan, J.H., Liu, Z.Q., Mao, X.H., *et al.* (2020) Global Trends in the Incidence and Mortality of Esophageal Cancer from 1990 to 2017. *Cancer Medicine*, **9**, 6875-6887. <https://doi.org/10.1002/cam4.3338>
- [3] Tong, Y., Yang, L., Yu, C., *et al.* (2020) Tumor-Secreted Exosomal lncRNA POU3F3 Promotes Cisplatin Resistance in ESCC by Inducing Fibroblast Differentiation into CAFs. *Molecular Therapy—Oncolytics*, **18**, 1-13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32637576> <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.05.014>
- [4] Kang, M., Ren, M., Li, Y., *et al.* (2018) Exosome-Mediated Transfer of lncRNA PART1 Induces Gefitinib Resistance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma via Functioning as a Competing Endogenous RNA. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **37**, 171. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30049286> <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0845-9>
- [5] Yu, J., Wang, W., Yao, W., *et al.* (2020) Gambogic Acid Affects ESCC Progression through Regulation of PI3K/AKT/mTOR Signal Pathway. *Journal of Cancer*, **11**, 5568-5577. <https://doi.org/10.7150/jca.41115> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32913452>
- [6] Wang, M., Hao, C., Ma, Q., *et al.* (2016) DNA Image Cytometry Test for Primary Screening of Esophageal Cancer: A Population-Based Multi-Center Study in High-Risk Areas in China. *Chinese Journal of Cancer Research*, **28**, 404-412. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27647968 <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2016.04.03>

- [7] Sohda, M. and Kuwano, H. (2017) Current Status and Future Prospects for Esophageal Cancer Treatment. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **23**, 1-11. <https://doi.org/10.5761/atcs.ra.16-00162>
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=28003586
- [8] Pennathur, A., Gibson, M.K., Jobe, B.A. and Luketich, J.D. (2013) Oesophageal Carcinoma. *The Lancet*, **381**, 400-412. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60643-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60643-6)
- [9] Chaudhuri, A., Das, S. and Das, B. (2020) Localization Elements and Zip Codes in the Intracellular Transport and Localization of Messenger RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **11**, e1591. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32101377>
- [10] Soulard, M., Della Valle, V., Siomi, M.C., *et al.* (1993) hnRNP G: Sequence and Characterization of a Glycosylated RNA-Binding Protein. *Nucleic Acids Research*, **21**, 4210-4217. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7692398>
<https://doi.org/10.1093/nar/21.18.4210>
- [11] Delbridge, M.L., Lingenfelter, P.A., Distche, C.M. and Graves, J.A. (1999) The Candidate Spermatogenesis Gene RBMY Has a Homologue on the Human X Chromosome. *Nature Genetics*, **22**, 223-224. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10391206>
<https://doi.org/10.1038/10279>
- [12] Mazeyrat, S., Saut, N., Mattei, M.G. and Mitchell, M.J. (1999) RBMY Evolved on the Y Chromosome from a Ubiquitously Transcribed X-Y Identical Gene. *Nature Genetics*, **22**, 224-226. <https://doi.org/10.1038/10282>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10391207>
- [13] Song, Y., He, S., Ma, X., *et al.* (2020) RBMX Contributes to Hepatocellular Carcinoma Progression and Sorafenib Resistance by Specifically Binding and Stabilizing BLACAT1. *American Journal of Cancer Research*, **10**, 3644-3665. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33294259>
- [14] Shin, K.H., Kang, M.K., Kim, R.H., *et al.* (2006) Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein G Shows Tumor Suppressive Effect against Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research*, **12**, 3222-3228. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707624>
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2656>
- [15] Shin, K.H., Kang, M.K. and Park, N.H. (2008) Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein G, Nitric Oxide, and Oral Carcinogenesis. *Nitric Oxide*, **19**, 125-132. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474262>
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.04.012>
- [16] Sutherland, L.C., Rintala-Maki, N.D., White, R.D. and Morin, C.D. (2005) RNA Binding Motif (RBM) Proteins: A Novel Family of Apoptosis Modulators? *Journal of Cellular Biochemistry*, **94**, 5-24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15514923>
- [17] Pimenta, A.L., Di Martino, P. and Blight, M.A. (2006) Positive Correlation between *in Vivo* and *in Vitro* Assays for the Evaluation of *Pseudomonas virulence*. *Research in Microbiology*, **157**, 885-890. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901681>
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.06.005>
- [18] Martinez-Arribas, F., Agudo, D., Pollan, M., *et al.* (2006) Positive Correlation between the Expression of X-Chromosome RBM Genes (RBMX, RBM3, RBM10) and the Proapoptotic Bax Gene in Human Breast Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, **97**, 1275-1282. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552754>
- [19] Shin, K.H., Kim, R.H., Kang, M.K., *et al.* (2007) p53 Promotes the Fidelity of DNA End-Joining Activity by, in Part, Enhancing the Expression of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein G. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 830-840. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387044>
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.01.013>
- [20] Shin, K.H., Kim, R.H., Yu, B., *et al.* (2011) Expression and Mutation Analysis of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein G in Human Oral Cancer. *Oral Oncology*, **47**, 1011-1016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840245>
- [21] Knudsen, K.E., Diehl, J.A., Haiman, C.A. and Knudsen, E.S. (2006) Cyclin D1: Polymorphism, Aberrant Splicing and Cancer Risk. *Oncogene*, **25**, 1620-1628. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550162>
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209371>
- [22] Shan, Y.S., Hsu, H.P., Lai, M.D., *et al.* (2017) Cyclin D1 Overexpression Correlates with Poor Tumor Differentiation and Prognosis in Gastric Cancer. *Oncology Letters*, **14**, 4517-4526. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28943959>
<https://doi.org/10.3892/ol.2017.6736>
- [23] Radenkovic, S., Konjevic, G., Nikitovic, M., *et al.* (2021) Evaluation of Cyclin D1 Expression by Western Blotting Methods and Immunohistochemistry in Breast Cancer Patients. *Journal of BUON*, **26**, 475-482. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34076995>
- [24] Cheng, G., Zhang, L.M., Lv, W.Y., *et al.* (2015) Overexpression of Cyclin D1 in Meningioma Is Associated with Malignancy Grade and Causes Abnormalities in Apoptosis, Invasion and Cell Cycle Progression. *Medical Oncology*, **32**,

439. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0439-0>

- [25] Jain, A.K., Allton, K., Iacovino, M., *et al.* (2012) p53 Regulates Cell Cycle and microRNAs to Promote Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLOS Biology*, **10**, e1001268. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389628>
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001268>

NOTES

食管鳞状细胞癌: ESCC

细胞周期蛋白 D1: CyclinD1