

RBM8A 在膀胱尿路上皮癌中的表达及其意义

甘隆 卢海庆 李生华 温济勇 赵育青 刘宝利

【摘要】 目的 探讨核糖核酸结合基序蛋白 8A (RBM8A) 在膀胱尿路上皮癌中的表达及其意义。**方法** 收集 120 例膀胱尿路上皮癌组织、20 例癌旁组织及 10 例正常膀胱黏膜组织, 采用免疫组织化学染色检测组织中 RBM8A 的表达, 结合 RBM8A 表达强度分析其与患者临床病理特征的关系。**结果** 膀胱尿路上皮癌组织和癌旁组织的染色阳性率分别为 64.2%、10.0%, 比较差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。TNM 分期晚、肿瘤分化程度低的膀胱尿路上皮癌患者, 其 RBM8A 表达阳性率较高 (P 均 < 0.05)。膀胱尿路上皮癌患者中, RBM8A 蛋白表达阳性者术后中位无瘤生存时间为 22.7 个月, 短于 RBM8A 蛋白表达阴性者的 30.0 个月。**结论** RBM8A 在膀胱尿路上皮癌中表达增强, 与不良预后相关, 有望作为诊断膀胱癌的生物标志物。

【关键词】 膀胱尿路上皮癌; 核糖核酸结合基序蛋白 8A; 免疫组织化学; 临床病理特征; 预后

Expression and significance of RBM8A in bladder urothelial carcinoma Gan Long, Lu Haiqing, Li Shenghua, Wen Jiyong, Zhao Yuqing, Liu Baoli. Department of Urology, Guiping People's Hospital, Guiping 537200, China

Corresponding author, Lu Haiqing, E-mail: lhq3026@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression level and significance of RNA binding motif protein 8A (RBM8A) in bladder urothelial cancer. **Methods** The bladder cancer tissues were collected from 120 patients, para-cancerous tissues from 20 and normal bladder mucosal tissues from 10, respectively. The expression level of RBM8A in the tissues was detected by immunohistochemical staining. The relationship between the expression of RBM8A and clinicopathological features of patients was analyzed. **Results** The positive rate of RBM8A in the bladder cancer tissues was 64.2%, significantly higher compared with 10.0% in the para-cancerous tissues ($P < 0.001$). Patients with advanced TNM stage and low degree of tumor differentiation had high positive rate of RBM8A (both $P < 0.05$). The tumor-free survival time in bladder urothelial cancer patients with high positive rate of RBM8A protein was 22.7 months, shorter than 30.0 months in their counterparts with negative rates of RBM8A protein. **Conclusions** The positive rate of RBM8A is up-regulated in patients with bladder urothelial cancer, which is correlated with poor prognosis. It is a promising biomarker for the diagnosis of bladder cancer.

【Key words】 Bladder urothelial carcinoma; RNA binding motif protein 8A; Immunohistochemistry; Clinicopathological feature; Prognosis

膀胱癌指发生在膀胱黏膜上的恶性肿瘤, 是泌尿系统最常见的恶性肿瘤。膀胱癌患者的高发年龄是 50 ~ 70 岁, 膀胱尿路上皮癌 (TCCB) 占膀胱癌患者总数的 90% 以上^[1]。70% 的患者初诊时为非肌层浸润性尿路上皮癌, 局部治疗有效, 但仍有

20% 的患者进展为肌层浸润性尿路上皮癌。另外 25% 的患者在初诊时即为肌层浸润性尿路上皮癌, 5% 患者合并远处转移, 对于局部晚期和远处转移的患者, 现有治疗方案效果欠佳, 5 年生存率大约为 15%^[2]。随着人类基因组学研究的逐渐深入,

特定的分子和基因标志物正逐渐取代常规的细胞和组织病理成为恶性肿瘤具体分型的依据,这样更有利于揭示膀胱癌发生发展的病理生理过程,寻找针对性更强的诊疗方案。核糖核酸结合基序蛋白 8A (RBM8A) 基因可通过调控不同 mRNA 的剪切拼接,参与 RNA 代谢的多方面功能,对细胞生长、分化、凋亡等过程产生广泛影响^[3],其功能异常直接导致细胞增殖分化障碍。现有研究表明,RBM8A 在多种肿瘤中呈高表达^[4]。目前尚无 RBM8A 在膀胱恶性肿瘤中相关研究,笔者在查询 Oncomine 数据库时发现,RBM8A mRNA 在多个膀胱癌组织中表达明显升高。为进一步明确 RBM8A 与膀胱癌之间的相关性,本研究检测了膀胱尿路上皮癌组织和非癌组织中 RBM8A 的表达,并分析其与患者临床病理特征的相关性,以探讨 RBM8A 在膀胱癌发病过程中的作用。

对象与方法

一、研究对象

1. 病例选择标准

包括:①2010 年 1 月至 2014 年 6 月间在桂平市人民医院住院经病理确诊且保留可供 RBM8A 检测组织标本的膀胱尿路上皮癌患者;②年龄 18~75 岁,有完整的临床资料;③美国东部肿瘤协作组 (ECOG) 体能状况评分 ≤ 2 分;④无全身远处器官转移,无合并明显的主要器官功能损害;⑤中性粒细胞 $>1.5 \times 10^9/L$,血红蛋白 $\geq 80 g/L$,血小板 $\geq 75 \times 10^9/L$,总胆红素 <1.5 倍正常值,转氨酶 ≤ 2.5 倍正常值。

2. 入组对象的一般资料

按上述标准共纳入 120 例膀胱尿路上皮癌患者。其中男 82 例、女 38 例,年龄 30~75 岁、中位年龄 65 岁;临床分期按 AJCC-TNM 标准,非浸润性膀胱癌 (Ta-T1) 75 例、浸润性膀胱癌 (T2-T3) 45 例;病理分级按 WHO 标准,G1 68 例、G2~G3 52 例。本研究经桂平市人民医院医学伦理委员会批准,入组患者均签署知情同意书。

3. 病理标本来源

收集上述膀胱尿路上皮癌患者在膀胱癌根治切除术后的病理蜡块。另随机抽取 20 例远离肿瘤的癌旁组织和 10 例正常膀胱黏膜作为对照组。

二、检测方法

1. 主要检测仪器

包括轮转切片机 (Rm2235, LEICA 公司), 烤

箱 (上海跃进医疗器械厂), 微量移液器 (Eppendorf 公司), 显微镜 (B $\times 40$ 型) (Olympus 公司) 和 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统 (北京麦克奥迪图像技术有限公司)。

2. 主要检测试剂

一抗使用鼠抗人单克隆抗体 RBM8A (Thermoscientific 公司), 二抗使用免疫组织化学染色 (免疫组化) MaxVision™ 鼠/兔-辣根过氧化物酶 (HRP) 广谱检测试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司) 和二氨基苯胺 (DAB) 显色试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司)。

3. 免疫组化检测及结果判定

将组织石蜡切片按照说明书步骤染色、固定处理,封片后进行后续结果判定。RBM8A 主要位于肿瘤细胞胞质,呈深棕黄色或黄褐色颗粒状染色。由 2 名中级或以上职称的病理科医师采用 13 点评分进行半定量分析:①按切片中显色细胞数比例计分,无细胞显色为 0 分、显色细胞占细胞总数 $<10\%$ 为 1 分、显色细胞占细胞总数 $10\% \sim 49\%$ 为 2 分、显色细胞占细胞总数 $50\% \sim 79\%$ 为 3 分、显色细胞占细胞总数 $\geq 80\%$ 为 4 分;②按切片中细胞显色强度计分,细胞无显色为 0 分、呈浅黄色 (弱染色) 为 1 分、呈棕黄色 (中等染色) 为 2 分、呈棕褐色 (强染色) 为 3 分。总分为显色细胞数与显色强度评分的乘积,0~2 分为阴性,大于 2 分者为阳性^[5-6]。

三、随访方法

对 120 例膀胱尿路上皮癌患者进行随访分析,记录其肿瘤转移、复发或患者死亡时间。患者相关的随访资料通过电话收集,随访时间从治疗结束出院开始计算,每例患者每半年通过电话随访 1 次,随访截止日期为 2017 年 6 月 1 日,中位随访时间为 48 个月。

四、统计学处理

使用 SPSS 16.0 分析数据。计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。应用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、RBM8A 蛋白在膀胱尿路上皮癌组织和癌旁组织中的表达:

免疫组化显示,RBM8A 在膀胱尿路上皮癌组织中呈高表达,主要位于肿瘤细胞胞质,呈深棕黄色或黄褐色颗粒状染色 (图 1A);癌旁组织染色较

癌组织弱(图 1B);正常膀胱黏膜组织染色均为阴性(图 1C)。膀胱尿路上皮癌癌组织和癌旁组织的

染色阳性率分别为 64.2%、10.0%，比较差异有统计学意义($P<0.001$)，见表 1。

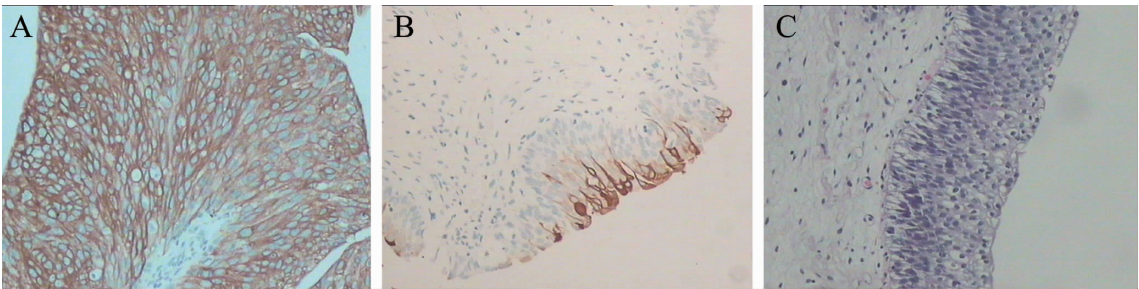


图1 RBM8A 蛋白在膀胱尿路上皮癌、癌旁组织和正常膀胱黏膜的表达情况(免疫组化染色, ×40)

A: 膀胱尿路上皮癌; B: 癌旁组织; C: 正常膀胱黏膜

表 1		癌旁组织与癌组织 RBM8A		例（%）	
		表达情况比较			
标本来源	例数	RBM8A 表达		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
癌旁组织	20	18(92.0)	2(10.0)	20.46	<0.001
癌组织	120	43(35.8)	77(64.2)		

二、RBM8A 蛋白与膀胱尿路上皮癌患者临床病理特征的相关性

T2~T3 期浸润性膀胱癌患者以 RBM8A 阳性为主,达 77.8%,Ta~T1 期 RBM8A 阳性率仅占 56.0%,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$);病理分级 G2~G3 患者中,RBM8A 阳性率为 76.9%,高于 G1 的 54.4%,两者比较差异有统计学意义($P=0.011$)。另外,RBM8A 表达水平与患者年龄和性别无关(P 均 >0.05),见表 2。

表2 不同临床病理特征的膀胱尿路上皮癌

患者 RBM8A 表达情况比较				例 (%)	
项 目	例数	RBM8A 表达		χ^2 值	<i>P</i> 值
		阴性	阳性		
年龄				0.055	0.814
≤60 岁	77	27(35.1)	50(64.9)		
>60 岁	43	16(37.2)	27(62.8)		
性别				0.004	0.951
男	82	29(35.4)	70(64.6)		
女	38	14(36.8)	33(63.2)		
TNM 分期				5.801	0.016
Ta ~ T1	75	33(44.0)	42(56.0)		
T2 ~ T3	45	10(22.2)	35(77.8)		
病理分级				6.494	0.011
G1	68	31(45.6)	37(54.4)		
G2 ~ G3	52	12(23.1)	40(76.9)		

三、RBM8A 蛋白与浸润性膀胱癌患者术后无瘤生存时间的相关性

最后一次随访结束时,75 例浅表性膀胱癌的患者中,未出现肿瘤复发 55 例,失访 10 例;45 例浸润性膀胱癌患者中,RBM8A 表达阴性的 10 例中,未出现肿瘤复发 4 例,RBM8A 表达阳性的 35 例中,未出现肿瘤复发 3 例,失访 4 例。RBM8A 蛋白表达阳性者术后中位无瘤生存时间为 22.7 个月,短于 RBM8A 蛋白表达阴性者的 30.0 个月,见图 2。

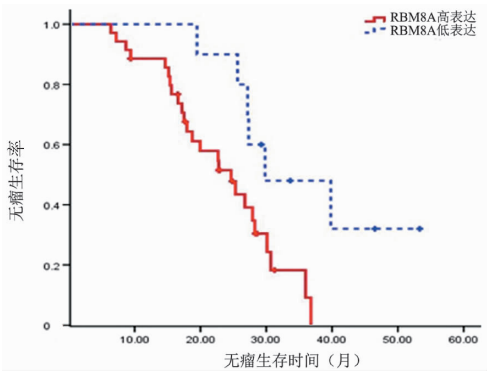


图2 RBM8A 表达与浸润性膀胱癌患者预后的关系

讨 论

RBM8A 编码 4 个转录子,在细胞内广泛表达,穿梭于胞浆和胞核内。其作为外显子拼接复合体(EJC)中的核心部件,作用是补充人类上游移码突变体(hUpf)到 EJC 上,从而触发无义介导 mRNA 降解(NMD),是 NMD 发生过程中必不可少的物质^[3]。基因组学技术的发展逐渐揭示了 RBM8A 基因与疾病的关系。以巨核细胞生成障碍导致血小板减少,伴双侧桡骨缺如和出血为主要临床表现的血小板减少伴桡骨缺失综合征(TAR)就是 RBM8A 基因突变引起的,主要机制之一就是造血细胞的分化成熟障碍,患儿同时也会表现出智力缺陷^[7]。在

多种中枢神经系统疾病中均发现 RBM8A 基因的异常表达^[8]。Zou 等^[9]报道, RBM8A 与神经细胞的增殖分化密切相关。Silver 等^[10]发现, RBM8A 可能通过破坏有丝分裂纺锤体的完整性, 影响染色体的数目和基因组的稳定性, 干扰神经系统的正常分化和发育。

近年研究发现, RBM8A 在肝癌、非小细胞肺癌等多种癌组织中均呈高表达, 并与肿瘤的生物学行为有关^[6]。Ishigaki 等^[11]在对人宫颈癌细胞株 (HeLa) 及人肺腺癌细胞株 (A549) 的研究结果显示, 沉默 RBM8A 基因后, 肿瘤细胞凋亡增加, 增殖活性受抑制, 细胞周期停滞在 M 期, 有丝分裂速度减慢, 肿瘤细胞的恶性生物学行为发生改变。既往研究显示, 肿瘤细胞的分化程度与其恶性程度密切相关, 细胞分化程度越低, 增殖越活跃, 有丝分裂周期越短, 恶性程度越高, 因此预后越差。上述研究提示, RBM8A 广泛参与细胞生长、分化、凋亡等过程, 与恶性肿瘤发生、发展密切相关, 其中分化成熟障碍可能是 RBM8A 潜在的作用机制, 值得进一步深入探索。

膀胱癌的发生、发展是一个多基因、多阶段、多步骤渐进演化过程, 该过程涉及到众多原癌基因的激活、肿瘤抑制基因的突变或失活、细胞凋亡机制紊乱、信号转导通路异常等多因素协同作用^[12-13]。笔者查询 Oncomine 数据库 (<http://www.oncomine.org>) 发现, RBM8A mRNA 在多个膀胱癌组织中表达明显升高, 且与 MTF2、CASP3、ERCC3 和 ATR 等基因存在共表达关系。在 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org>) 中可知, MTF2 主要影响组蛋白甲基化, 处于细胞自我更新和分化调节转录网络中; CASP3 编码的是与肿瘤凋亡密切相关的激酶蛋白; ERCC3 和 ATR 编码的是 DNA 损伤修复相关的蛋白。进一步查询 THE HUMAN PROTEIN ATLAS 数据库 (<https://www.proteinatlas.org>) 发现 MTF2、CASP3、ERCC3 和 ATR 蛋白在多种恶性肿瘤中表达升高且与不良预后相关。本研究采用免疫组化检测了膀胱尿路上皮癌组织和癌旁组织中 RBM8A 的表达。结果显示, 在膀胱尿路上皮癌组织中 RBM8A 阳性率高于癌旁组织、正常膀胱黏膜组织。进一步研究结果显示, 肿瘤分化程度越低, RBM8A 阳性率越高, 浸润性膀胱癌患者术后无瘤生存时间越短。

上述多项研究提示, RBM8A 阳性表达与患者的不良预后直接相关, RBM8A 可能参与膀胱癌发

生过程的早期生物学事件, 并在肿瘤的进程中起着重要的作用, 但本研究仅检测膀胱癌组织中 RBM8A 蛋白的表达, 其具体作用和机制尚不清楚。后续研究将通过体内细胞试验和体外动物模型进一步深入探讨 RBM8A 基因与膀胱癌生物学行为之间的关系, 寻找其发挥作用的信号通路和上下游的关键基因, 以阐明其在恶性肿瘤中的生物学机制, 为膀胱癌的早期诊断、靶向治疗、预后判断、复发监测提供新的途径。

参 考 文 献

- [1] 李辽源, 吴杰英, 刘绍远, 杨明, 罗子寰, 张凌霄, 高新, 孟占鳌. 膀胱尿路上皮癌组织中 DACH2 的表达及临床意义. 中华腔镜泌尿外科杂志 (电子版), 2016, 10 (6): 415-419.
- [2] National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. SEER Stat Fact Sheets; Bladder Cancer. [2017-07-20]. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>.
- [3] Chuang TW, Lee KM, Tarn WY. Function and pathological implications of exon junction complex factor Y14. *Biomolecules*, 2015, 5 (2): 343-355.
- [4] Chuang TW, Chang WL, Lee KM, Tarn WY. The RNA-binding protein Y14 inhibits mRNA decapping and modulates processing body formation. *Mol Biol Cell*, 2013, 24 (1): 1-13.
- [5] 朱丽君. RNA 结合基序蛋白 8A 在肝癌组织中的表达及意义. 广西医科大学, 2015.
- [6] Liang R, Lin Y, Ye JZ, Yan XX, Liu ZH, Li YQ, Luo XL, Ye HH. High expression of RBM8A predicts poor patient prognosis and promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 2017, 37 (4): 2167-2176.
- [7] Albers CA, Paul DS, Schulze H, Freson K, Stephens JC, Smethurst PA, Jolley JD, Cvejic A, Kostadima M, Bertone P, Breuning MH, Debili N, Deloukas P, Favier R, Fiedler J, Hobbs CM, Huang N, Hurles ME, Kiddle G, Krapels I, Nurden P, Ruivenkamp CA, Sambrook JG, Smith K, Stemple DL, Strauss G, Thys C, van Geet C, Newbury-Ecob R, Ouwehand WH, Ghevaert C. Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat Genet*, 2012, 44 (4): 435-439, S1-S2.
- [8] Nguyen LS, Kim HG, Rosenfeld JA, Shen Y, Gusella JF, Lacassie Y, Layman LC, Shaffer LG, Géczy J. Contribution of copy number variants involving nonsense-mediated mRNA decay pathway genes to neuro-developmental disorders. *Hum Mol Genet*, 2013, 22 (9): 1816-1825.
- [9] Zou D, McSweeney C, Sebastian A, Reynolds DJ, Dong F, Zhou Y, Deng D, Wang Y, Liu L, Zhu J, Zou J, Shi Y, Albert I, Mao Y. A critical role of RBM8a in proliferation and differentiation of embryonic neural progenitors. *Neural Dev*, 2015, 10:

- 18.
- [10] Silver DL, Watkins-Chow DE, Schreck KC, Pierfelice TJ, Larson DM, Burnetti AJ, Liaw HJ, Myung K, Walsh CA, Gaiano N, Pavan WJ. The exon junction complex component Magoh controls brain size by regulating neural stem cell division. *Nat Neurosci*, 2010, 13 (5): 551-558.
- [11] Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Shimasaki T, Iwabuchi K, Tomosugi N. Depletion of RNA-binding protein RBM8A (Y14) causes cell cycle deficiency and apoptosis in human cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238 (8): 889-897.
- [12] Kurtoglu M, Davarpanah NN, Qin R, Powles T, Rosenberg JE, Apolo AB. Elevating the horizon: emerging molecular and genomic targets in the treatment of advanced urothelial carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*, 2015, 13 (5): 410-420.
- [13] 葛曙雄, 王涌. 微小 RNA 与肿瘤微环境. *新医学*, 2016, 47 (1): 7-11.

(收稿日期: 2017-12-10)

(本文编辑: 林燕薇)

