

白血病中 RNA 结合蛋白 RNPC1 的表达及意义

唐青青 陆伟 张海健 张亚平 刘红 杨露君 袁莹莹 胡成俊 陈秀芳

【摘要】 目的 探讨白血病患者中 RNPC1 的表达水平及其在白血病发生、发展中的意义。**方法** 采用 RT-PCR 法、Western blot 法分别从 mRNA 和蛋白质水平检测 54 例白血病患者和 10 例健康者骨髓单个核细胞中 RNPC1 的表达情况。采用 χ^2 检验、*t* 检验进行统计分析, 比较各组 RNPC1 表达阳性率的差异。**结果** (1) 90.7% 的白血病患者表达不同程度的 RNPC1。(2) RNPC1 在白血病患者中的表达明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。(3) 多种分型的白血病中均有 RNPC1 表达, 且各分型之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** RNPC1 过度表达在白血病的发病机制中起重要的作用。

【关键词】 白血病; 发病机制; RNPC1

Overexpression and clinical implication of RNPC1 oncogene in leukemia Tang Qingqing, Lu Wei, Zhang Haijian, Zhang Yaping, Liu Hong, Yang Lujun, Yuan Yingying, Hu Chengjun, Chen Xiufang. The Blood Research Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China
Corresponding author: Chen Xiufang, Email: chenxiufang818@sina.com

【Abstract】 Objective To discuss the over-expression and effect of the RNPC1 in patients with leukemia. **Methods** The expression of RNPC1 gene in 54 patients with leukemia and 10 healthy as control was measured by relative quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot, then the results were measured by χ^2 -test and *t*-test to compare expression positive rate and intensity of RNPC1. **Results** Among 54 patients, forty-nine had the high expression of RNPC1 gene (90.7%). The expression level of RNPC1 gene in acute leukemia patients was higher than that of health controls ($P < 0.05$). **Conclusion** Our results indicate that the expression of RNPC1 gene plays an important role in the pathogenesis of acute leukemia.

【Key words】 Leukemia; Pathogenesis; RNPC1

RRM (RNA recognition motif) RNA 结合蛋白是一类含一个或数个 RRM 结构域及附属结构域的 RNA 结合蛋白, 这类蛋白与 mRNA 有高度亲和性, 参与 RNA 剪接、多聚腺苷化作用、序列编辑、RNA 转运、维持 RNA 的稳定和降解、细胞内定位和翻译控制等^[1]。RNPC1 基因又称为 RBM38, 定位于 20q13, 有学者认为 RNPC1 属于 RRM RNA 结合蛋白家族中的一员^[2]。Zhang 等^[3]研究发现在人类的生

活伴侣狗的淋巴瘤中存在 RNPC1 的过表达。到目前为止, RNPC1 在白血病中的表达情况尚无定论。本文采用半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 及 Western blot 法分别从 mRNA 和蛋白质水平检测 54 例白血病患者 RNPC1 基因的表达情况, 旨在探讨 RNPC1 基因与白血病发病的关系。

资料与方法

一、一般资料

2012 年 7 月至 2013 年 5 月在南通大学附属医院血液科住院的白血病患者 54 例, 病例均经临床、骨髓涂片细胞形态学及细胞化学检查, 并按文献^[4]确诊。其中包括初治 36 例, 复发难治 18 例。按 FAB 分型: 急性髓细胞白血病 24 例 (M₂ 2 例, M₃ 6 例,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.05.005

基金项目: 江苏省第九批“六大人才高峰”资助项目 (WS-063)

作者单位: 226001 江苏省, 南通大学附属医院血液研究室[唐青青(在读硕士研究生)、陆伟、张海健、张亚平、刘红、杨露君、袁莹莹、胡成俊、陈秀芳]

通讯作者: 陈秀芳, Email: chenxiufang818@sina.com

M₄ 2例, M₅ 12例, M₆ 2例); 慢性粒细胞白血病 10例(慢性期 2例, 加速期 6例, 急变期 2例); 急性淋巴细胞白血病 10例; 慢性淋巴细胞白血病 8例; 毛细胞白血病 2例。男 38例, 女 16例, 年龄 24~80岁, 中位年龄 58岁。对照组 10例, 为同期的非恶性血液系统疾病且骨髓形态学未见明显异常者。

二、试验方法

1. 分离单个核细胞: 收集 54 例白血病患者及 10 例健康者的骨髓 2 ml。应用梯度密度离心法分离单个核细胞。

2. RT-PCR 法: 提取 RNA: 用 TRIzol 提取液提取细胞总 RNA, 将其溶于 20 μ l 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 液中, 通过紫外分光光度仪鉴定其纯度及完整性。RNPC1 上游引物: 5'-ACTACCGAC GCCTCGCTCAG-3', 下游引物: 5'-CCCAGATATG CCAGGTTACAC-3' (为 UC DAVIS Xinbin Chen Lab 馈赠)。GAPDH 上游引物: 5'-CAAGGTCATCCAT GACAACCTTTG-3', 下游引物: 5'-GTCCACCACCCT GTTGCTGTAG-3'。cDNA 合成: 20 μ l 反应体系, 反应条件: 42 $^{\circ}$ C 60 min, 70 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 扩增: RNPC1、GAPDH 的 cDNA 逆转录产物 3 μ l, 总反应体系 20 μ l。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min; 变性 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 54 $^{\circ}$ C 35 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。电泳及扫描分析: 2% 琼脂糖凝胶中, 上述 PCR 产物电泳 45 min。在凝胶成像系统下摄片。

3. Western blot 方法: 提取蛋白质: 用 RIPA 裂解液提取细胞蛋白质, 通过紫外分光光度仪测定其浓度。电泳: 配制 10% 的分离胶及 5% 的基层胶后, 加入 20 μ l 蛋白样品, 进行电泳, 至溴酚蓝跑到胶底、Marker 分开且条带清晰后停止电泳。转膜: 通过半干转膜法将胶上的蛋白条带转至 PVDF 膜上。封闭: 用 TBST 封闭 PVDF 膜。孵育抗体: 依次孵育一抗 (4 $^{\circ}$ C, 过夜)、二抗。显影: 滴加 Milipore 发光液在凝胶成像系统下摄片。

三、统计学方法

采用 SPSS 17.0 版本, 试验数据用均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。RNPC1 在白血病细胞及不同细胞类型中的阳性表达情况采用 χ^2 检验及 t 检验进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、白血病患者与对照组 RNPC1 表达的比较

90.7% 的白血病患者表达不同程度的 RNPC1

基因。白血病患者与对照组中 RNPC1 表达阳性率见表 1。RT-PCR 方法检测白血病患者 RNPC1 mRNA 的表达结果见图 1, 表达强度见图 2。Western blot 法检测白血病患者 RNPC1 蛋白质的表达见图 3。

表 1 白血病患者与对照组中 RNPC1 表达阳性率的比较 (例)

组别	RNPC1 阳性	RNPC1 阴性	合计
白血病患者	49	5	54
对照组	0	10	10
合计	49	15	64

白血病患者 54 例, RNPC1 阳性表达 49 例, 对照组 10 例 RNPC1 为阴性, $\chi^2 = 33.82$, $P < 0.05$, 两者之间的差异有统计学意义。

二、白血病患者各分型间 RNPC1 表达的比较

RNPC1 基因在白血病各分型中均表达, 但各分型之间表达水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 RNPC1 在各型白血病中的表达情况

组别	例数	RNPC1 阳性表达(例)	RNPC1 表达率(%)
AML			
M2	2	2	100
M3	6	5	83.3
M4	2	2	100
M5	12	11	91.7
M6	2	2	100
CML	10	8	80.0
ALL	10	9	90.0
CLL	8	8	100
HCL	2	2	100
合计	54	49	90.7

讨 论

真核生物基因表达调控包括转录水平调控和转录后水平调控。转录后水平调控包括 mRNA 稳定性调控和翻译水平调控。mRNA 稳定性调节在真核细胞基因表达调控中起重要作用, 其主要机制是通过影响 mRNA 的降解速率影响蛋白质的翻译效率^[5]。多种蛋白质参与转录后水平调控, 其中最重要的是各种 RNA 结合蛋白。到目前为止, 研究最多的 RNA 结合蛋白是具有 RRM 的 RNA 结合蛋白。RRM 也称为 RNP (ribonucleo protein motif) 基序或 CS-RBD (consensus sequence RNA-binding domain)^[6]。最近研究认为 RNPC1 属于 RRM RNA 结合蛋白家族中的一员。

RNPC1 的 RNA 结合活性和 MDM2 基因 3'-UTR

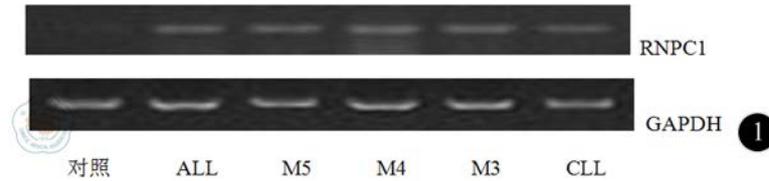


图1 RT-PCR法检测RNPC1基因在恶性血液病中的表达情况。对照：健康者；ALL：急性淋巴细胞白血病；M5：急性单核细胞白血病；M4：急性粒-单核细胞白血病；M3：急性早幼粒细胞白血病；CLL：慢性淋巴细胞白血病

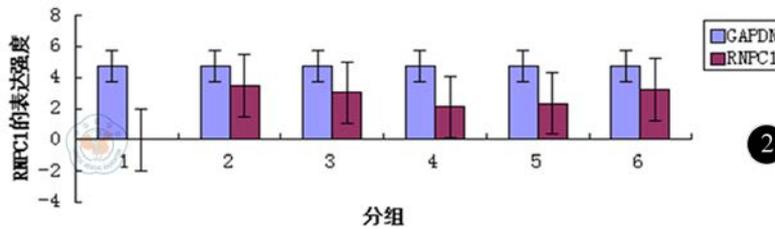


图2 RNPC1在恶性血液病中的表达强度。1：健康者；2：急性淋巴细胞白血病；3：急性单核细胞白血病；4：急性粒-单核细胞白血病；5：急性早幼粒细胞白血病；6：慢性淋巴细胞白血病

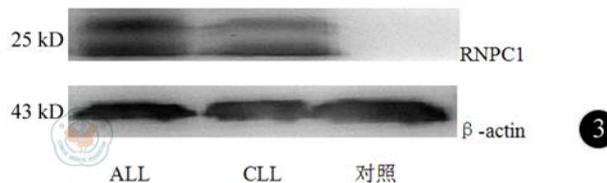


图3 Western blot法检测RNPC1基因在白血病中的表达情况。ALL：急性淋巴细胞白血病；CLL：慢性淋巴细胞白血病；对照：健康组

在 RNPC1 结合和抑制 MDM2 表达中起重要作用。MDM2 基因定位于 12q13~14, MDM2 基因产物 P90 与 P53 蛋白结合, 使 P53 失去抑制肿瘤发生发展的功能^[7]。急性白血病患者中发现有 MDM2 基因的 mRNA 表达增高^[8-9]。顺式调控元件和反式作用因子维持 mRNA 合成和降解的平衡。ARE(AU-rich element)是位于 mRNA 3'端非翻译区(3'-untranslated regions, 3'-UTR)的一类非常重要的顺式调控元件^[10]。ARE 能够招募许多 ARE 结合蛋白(ARE-binding proteins, ARE-BPs), 这些 ARE-BPs 相互协作或竞争性地与 mRNA 的 ARE 结合, 共同调节 mRNA 的稳定性和翻译水平^[11]。3'-UTR 可以调节转录本的稳定性、定位和翻译水平^[12]。转录本的降解始于 poly(A) 缩短或不依赖去腺苷酸化的核仁的断裂, 调节蛋白通过与 3'UTR 顺式元件区结合, 影响 mRNA 的稳定性^[13]。MDM2 基因的 3'UTR 包含几个 Cis 调控因子如 AREs, 这些调控因子可以与小干扰 RNA 或 RNA 结合蛋白结合, 影响 MDM2 的表达, 如 miR-143、miR-145、miR605 在翻译后水平抑制 MDM2 的表达^[14-15]。Xu 等^[16]研究发现,

RNPC1 可以结合 MDM2 基因 3'UTR 的多个位点并抑制 MDM2 的表达。相反, 敲除 RNPC1 基因以后, MDM2 的表达增加。RNPC1 基因在白血病的发病中作用是否与其影响 MDM2 基因的表达而发挥作用, 有必要进行深入研究。

研究表明 RNPC1 还可以通过抑制 P53 的翻译在肿瘤的发生、发展中起重要作用, RNPC1 基因是 P53 家族的一个靶基因^[3]。P53 基因是人类肿瘤相关性最大的抑癌基因之一^[17], 被称为“基因卫士”。半数以上的人类肿瘤中存在 P53 基因突变或 P53 功能失活^[18]。P53 的功能主要包括对细胞周期短暂或长期阻滞、DNA 复制及细胞凋亡, 从而维持细胞基因组的完整性或阻止癌细胞的早期增殖^[19]。P53 蛋白的稳定表达对执行其重要功能有意义, 其调节机制依赖于 P53 与其他蛋白的相互作用及 P53 蛋白的翻译后修饰。真核细胞翻译起始因子 4E(Eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E)可特异性地结合 mRNA 5'端 m7GpppN 帽结构, 影响 mRNAs 的代谢、加工、运输、翻译等, 在蛋白质合成中起重要的调控作用^[20]。Zhang 等^[3]研究提示: RNPC1 通过 C 端与 eIF4E 相

互作用、N端与P53 mRNA结合而阻碍eIF4E与P53结合,从而妨碍P53翻译起始复合物的形成,可致P53翻译量下降。正常情况下,P53维持RNPC1水平的表达;而受DNA损伤、缺氧等应激时,P53基因将刺激信号传入细胞,并作为转录因子促进RNPC1的表达,过表达的RNPC1反作用于P53,因此形成了一个新的P53反馈调控循环^[3]。

有研究发现在狗淋巴瘤中存在RNPC1的过表达,且此过表达大部分伴有野生型P53基因表达量减少^[3]。因此提示RNPC1基因可能在淋巴瘤的发病中起重要作用。淋巴瘤在狗恶性肿瘤中的发病率大约为6%,这与人类淋巴瘤发病率基本相似^[21],狗淋巴瘤在组织病理学、解剖、生物学行为及治疗等方面与人类的淋巴瘤亦相似^[22-23]。Zhang等研究表明,狗淋巴瘤细胞系RNPC1表达水平增高,本研究显示,RNPC1基因在对照组骨髓单个核细胞中的表达为阴性,在白血病患者中RNPC1表达阳性率为90.7%,显著高于对照组。本结果与Zhang等的研究结果相似。本研究中RNPC1在多种类型的白血病中不同程度地高表达,因此推测RNPC1在白血病的发病机制中起重要作用。这可能与RNPC1基因的RNA结合活性及RNPC1通过抑制P53基因的翻译有关。迄今为止尚没有相关文献报道RNPC1基因与白血病的关系,因此需要更多的实验来验证其在白血病中的表达情况及各亚型的关系,进而探讨白血病新的发病机制,为临床治疗提供新的思路。本研究提示RNPC1可能是人类白血病诊断和治疗的一个潜在靶点,RNPC1可能在白血病的形成过程中起重要作用。

参 考 文 献

- [1] 周红梅. RNA结合蛋白LIN28的研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(20): 3055-3058.
- [2] Cho SJ, Jung YS, 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 Biochem, 2012, 287(18): 14535-14544.
- [3] Zhang J, Cho SJ, Shu L, et al. Translational repression of p53 by RNPC1, a p53 target overexpressed in lymphomas[J]. Genes Dev, 2011, 25(14): 1528-1543.
- [4] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3版. 天津: 天津科学技术出版社, 2007: 214-218.
- [5] Benjamin D, Moroni C. mRNA stability and cancer: an emerging link[J]. Expert Opin Biol, 2007, 7(10): 1515-1529.
- [6] Burd CG, Dreyfuss G. Conserved structure and diversity of functions of RNA-binding proteins[J]. Science, 1994, 265(5172): 615-621.
- [7] 羊暑艳, 万沁. MDM2/P53通路与心血管疾病的研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(22): 3379-3381.
- [8] 李茜汝, 苏丽萍, 张景萍, 等. 癌基因MDM2 mRNA在急性白血病的过度表达及其临床意义[J]. 白血病·淋巴瘤, 2010, 19(6): 323-326.
- [9] 马夫天, 姬静璐, 王素明, 等. 儿童急性白血病MDM2基因的表达及其临床意义[J]. 承德医学院学报, 2005, 22(2): 109-111.
- [10] 高媛, 马大鹏, 肖建华. RNA结合蛋白调节mRNA稳定性的作用机制[J]. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(2): 79-83.
- [11] 焦祖义. 细胞因子RNA转录后调控的研究进展[J]. 生命科学, 2010, 22(5): 437-443.
- [12] 陈淑华, 曾卫民, 宋惠萍. 真核生物mRNA 3'非翻译区的调控功能[J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2003, 23(6): 611-614.
- [13] Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells[J]. Gene, 2001, 265(1): 11-23.
- [14] Zhang J, Sun Q, Ge S, et al. loss of microRNA-143/145 disturbs cellular growth and apoptosis of human epithelial cancers by impairing the MDM2-P53 feedback loop[J]. Oncogene, 2012, 32(1): 61-69.
- [15] Xiao J, Lin H, Luo X, et al. miR-605 joins P53 network to form a P53: miR-605: MDM2 positive feedback loop in response to stress[J]. EMBO J, 2011, 30(3): 524-532.
- [16] Xu E, Zhang J, Chen X. MDM2 expression is repressed by the RNA-binding protein RNPC1 via mRNA stability[J]. Oncogene, 2013, 32(17): 2169-2178.
- [17] 潘少君, 王俊和. P73肿瘤抑制蛋白的调控和抗癌途径的研究进展[J]. 2011, 27(20): 3798-3799.
- [18] Royds JA, Iacopetta B. p53 and disease: when the guardian angel fails[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(6): 1017-1026.
- [19] Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate P53[J]. Oncogene, 2007, 26(9): 1306-1316.
- [20] Goodfellow IG, Roberts LO. Eukaryotic initiation factor 4E[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(12): 2675-2680.
- [21] 郭霞, 李强. 急性白血病发病机制研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(7): 690-693.
- [22] Greenlee PG, Filippa DA, Quimby FW, et al. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study[J]. Cancer, 1990, 66(3): 480-490.
- [23] Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(2): 147-156.

(收稿日期: 2013-12-24)

(本文编辑: 梁雷)