

RBM4 在食管癌组织中的表达及临床意义

崔建华¹, 陈冲¹, 周扬²

1. 东台市人民医院消化内科 江苏 盐城 224200; 2. 江苏医药职业学院医学院 江苏 盐城 224005

[摘要]目的: 探讨 RBM4 在食管癌组织中的表达及临床意义。方法: 采用 RT-qPCR 及 Western blot 法检测癌与癌旁组织、正常食管上皮细胞及食管细胞中 RBM4 的 mRNA 和蛋白表达水平; 采用免疫组织化学染色法检测并比较食管癌组织和癌旁正常组织中 RBM4 阳性表达率, 分析 RBM4 阳性表达与患者临床病理特征的相关性。结果: 与正常食管上皮细胞株 Het-1A 相比, 5 种食管癌细胞中 RBM4 的 mRNA 及蛋白水平均明显较低。RBM4 在癌旁组织、癌组织中的阳性率分别为 72.6% (77/106)、36.8% (39/106)。RBM4 表达与肿瘤大小、分化程度、T 分期相关 ($P < 0.05$), 且与 RBM4 阴性组患者相比, RBM4 阳性组患者的 OS 及 DFS 均显著较好。Cox 生存分析表明, RBM4 阴性表达是影响食管癌患者 OS 及 DFS 的独立性危险因素。结论: RBM4 在食管癌组织中表达明显减弱, 且其表达与食管癌患者淋巴结转移、临床分期、肿瘤大小负相关。可作为判断患者预后的可靠指标。

[关键词]食管癌; RNA 结合基序 4; 预后; 临床特征

[中图分类号] R735 [文献标识码] A [文章编号] 1687-9534(2025)-0078-43 [收稿日期] 2025-07-16

食管癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 在我国发病率和死亡率均居高不下。尽管近年来在手术、放疗、化疗等治疗手段上取得了一定进展, 但食管癌患者的 5 年生存率仍然较低, 预后不佳^[1]。因此, 深入研究食管癌的发生发展机制, 寻找新的分子标志物和治疗靶点具有重要的临床意义。RNA 结合基序蛋白 4 (RNA-binding motif protein 4, RBM4) 是一种多功能的 RNA 结合蛋白, 在转录后调控中发挥重要作用^[2]。RBM4 通过调节选择性剪接、mRNA 稳定性和翻译等过程, 参与细胞分化、凋亡、应激反应等多种生物学过程。近年来研究发现, RBM4 在多种恶性肿瘤中表达异常, 并与肿瘤的发生发展密

切相关。在肺癌、乳腺癌、结直肠癌等肿瘤中, RBM4 表达下调与肿瘤进展和不良预后相关, 提示其可能具有抑癌基因的功能^[3]。然而, 目前关于 RBM4 在食管癌中的表达情况及其临床意义的研究较少。RBM4 是否参与食管癌的发生发展过程, 其表达水平与食管癌患者的临床病理特征和预后是否存在相关性, 这些问题尚不明确。因此, 本研究旨在检测 RBM4 在食管癌组织中的表达情况, 分析其与临床病理参数的关系, 探讨 RBM4 表达对食管癌患者预后的影响, 为食管癌的诊断、治疗和预后评估提供新的分子标志物。

一、方法

(一) 一般资料

选取 2019 年 1 月-2023 年 1 月东台市人民医院收治的 106 例食管癌患者作为研究对象, 术中收集其癌组织与癌旁组织(距癌组织>2cm), 生理盐水洗净后于-80 °C 保存备用。纳入标准: ①患者均符合《食管癌规范化诊治指南》中食管癌的诊断标准; ②首次确诊食管癌; ③均接受手术治疗, 经术后病理学检查确诊为食管癌; ④手术治疗前未经放疗、化疗等相关治疗; ⑤后期治疗配合度高且愿意接受随访。排除标准: ①合并食管狭窄等良性食管病变; ②合并其他部位癌变; ③合并有严重心、肝、肾等重要器官病变; ④伴有感染性疾病、血液系统疾病、免疫系统疾病、精神障碍者。

(二) RT-qPCR 检测

Trizol 试剂盒、逆转录试剂盒均购自美国赛默飞公司, 操作均严格按照试剂盒说明书进行。采用 RT-qPCR 检测细胞及组织中 RBM4 mRNA 表达水平。提取样品总 RNA 后, 使用逆转录试剂盒制备 cDNA; 以 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 检测样品 RBM4 mRNA 表达水平。以 GAPDH 为内参, 反应体系 20 μ L: SYBR Green Master Mix 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 5 μ L, ROX Reference Dye 15 μ L。检测程序: 95 °C 预变性 1 min, 45°C 30 s, 60°C 60 s, 72°C 30 s, 循环 40 次。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算组织中 RBM4 相对表达量。

(三) 免疫组化染色

通过免疫组化法定性检测组织中 RBM4 蛋白表达情况: 将术中获取的癌组织与癌旁

组织制成 5 μ m 的石蜡切片, 然后进行脱蜡、复水、抗原修复、封闭, 然后 4 °C 条件下加入 RBM4 抗体(1:500 稀释) 孵育过夜。然后加入二抗, 反应 0.5 h, PBS 冲洗干净, 滴加 DAB 染色, 苏木精复染, 脱水透明、封片观察。以出现棕色颗粒为阳性表达。

(四) Western blot 检测

向组织中加入裂解液后进行裂解, 通过 BCA 蛋白定量方法测定蛋白液浓度, 总蛋白通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 随后将目的蛋白转膜到硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 封闭完成后加入相应蛋白一抗 4°C 孵育过夜, 第 2 天洗膜后加入相应二抗室温孵育 1 h, 最后通过 Odyssey 仪器扫描, 条带灰度值定量, 使用 Image J 软件分析。

(五) 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 计数资料以 n (%) 表示, 采用 χ^2 检验; 采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析癌组织 RBM4 表达与食管癌生存的关系; 采用 Cox 回归分析影响食管癌预后的危险因素。通过门诊和电话随访, 随访时间截止至 2023 年 11 月 30 日。OS (Overall survival) 定义为从术后第 1 天开始到最后一次随访或任何原因造成死亡的时间。DFS (Disease-free survival) 是指从随机化开始至疾病复发或由于疾病进展导致患者死亡的时间。所有患者均随访成功, 无失访患者。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

二、结果

(一) RBM4 在食管上皮细胞及食管癌细胞中表达

RT-qPCR 及 Western blot 检测显示，与正常食管上皮细胞株 Het-1A 相比，食管癌细胞 KYSE140、KYSE510、TE1、KYSE520、

KYSE410 中 RBM4 的 mRNA 及蛋白水平均明显较低。见图 1。

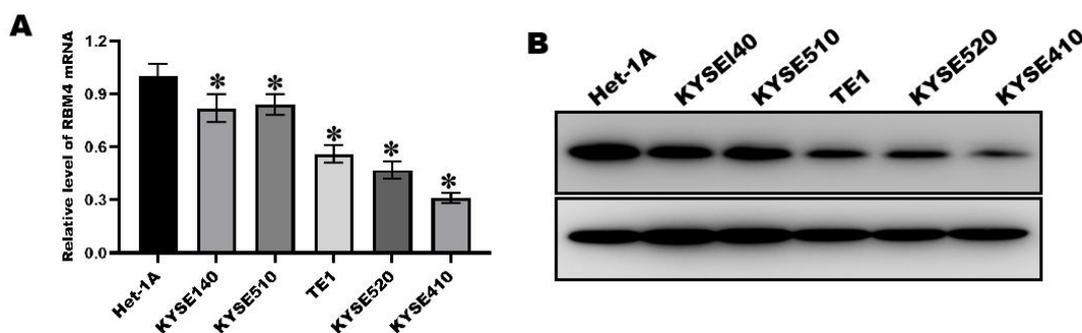


图 1 RBM4 在食管上皮细胞及食管癌细胞中表达

注：A：RT-qPCR 检测正常食管上皮细胞与食管癌细胞中 RBM4 mRNA 水平；B：Western blot 检测正常食管上皮细胞与食管癌细胞中 RBM4 蛋白水平

(二) RBM4 表达与食管癌患者临床病理参数的关系

免疫组化染色显示，RBM4 主要定位于细胞核。RBM4 在癌旁癌旁组织、食管癌组织中的阳性率分别为 72.6% (77/106)、36.8% (39/106)，食管癌组织中 RBM4 蛋白阳性表达率显著低于癌旁组织，差异有统计学意义 ($\chi^2=13.924, P<0.001$)。单因素分析显示，RBM4 表达与患者年龄、性别、肿瘤

部位、淋巴结转移和临床分期无明显相关性 ($P>0.05$)，但与肿瘤大小、分化程度、T 分期相关 ($P<0.05$)。

(三) RBM4 表达对患者预后的影响

Kaplan-Meier 生存分析和 log-rank 检验表明，与 RBM4 阴性组患者相比，RBM4 阳性组患者的 OS ($HR=$, $P<0.05$) 及 DFS ($HR=5.475, P=0.019$) 均显著较好。

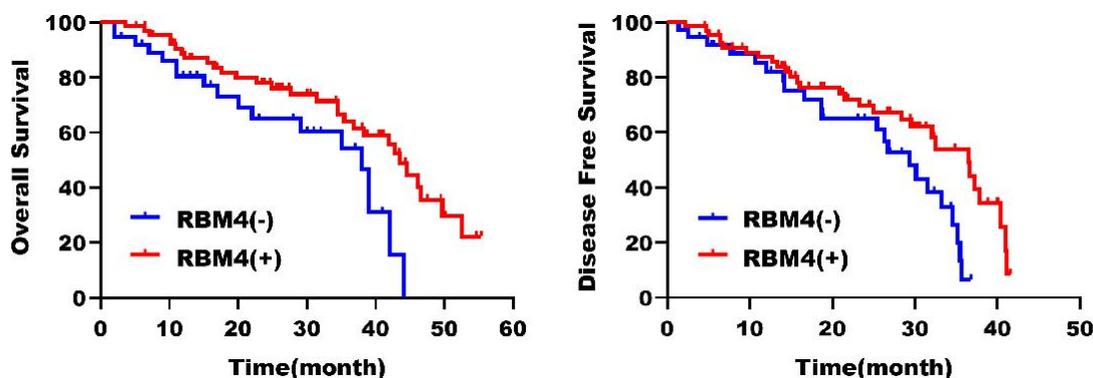


图 3 RBM4 表达对患者预后的影响

(四) 影响食管癌患者预后的 Cox 生存分析

多因素 Cox 生存分析表明，T 分期 ($HR=1.446, P<0.001$)、淋巴结转移 ($HR=2.57$

0, $P=0.002$)、临床分期 ($HR=2.247$, $P<0.001$)、RBM4 阴性 ($HR=1.482$, $P=0.040$) 均是影响食管癌患者 OS 的独立性危险因素; T 分期 ($HR=1.764$, $P<0.001$)、淋巴结转移 ($HR=2.360$, $P<0.001$)、临床分期 ($HR=2.883$, $P<0.001$)、RBM4 阴性 ($HR=1.682$, $P=0.026$) 也是影响食管癌患者 DFS 的独立性危险因素。

三、讨论

本研究发现 RBM4 在食管癌细胞系中的表达水平显著低于正常食管上皮细胞, 这一结果在组织水平得到了验证。免疫组化结果显示, 食管癌组织中 RBM4 的阳性表达率仅为 36.8%, 明显低于癌旁组织的 72.6%。这种表达差异提示 RBM4 可能在食管癌的发生发展过程中发挥抑癌基因的作用。这与既往在其他肿瘤中的研究结果一致, 如在肺癌、乳腺癌等恶性肿瘤中, RBM4 表达下调被认为是肿瘤进展的重要分子事件之一^[4,5]。其次, 本研究发现 RBM4 表达与食管癌的恶性生物学行为密切相关。RBM4 低表达与肿瘤体积增大、分化程度降低以及 T 分期进展相关, 这些病理特征均反映了肿瘤的侵袭性增强。值得注意的是, 虽然 RBM4 表达与淋巴结转移无明显相关性, 但其与原发肿瘤的局部进展密切相关, 提示 RBM4 可能主要通过调控肿瘤细胞的增殖和分化来影响食管癌的进展, 而对肿瘤的远处转移能力影响相对较小。

生存分析结果进一步证实了 RBM4 在食管癌预后评估中的重要价值。RBM4 阳性表达的患者无论是总生存期还是无病生存期均

显著优于 RBM4 阴性患者。更重要的是, 多因素 Cox 回归分析表明, RBM4 阴性表达是影响食管癌患者 OS 和 DFS 的独立危险因素, 其预后价值独立于 T 分期、淋巴结转移和临床分期等传统预后指标。这一发现提示 RBM4 可作为食管癌患者预后评估的新型分子标志物, 有助于识别高危患者并制定个体化治疗策略。RBM4 发挥抑癌作用的分子机制可能涉及多个方面^[6]。作为 RNA 结合蛋白, RBM4 可通过调节下游靶基因的选择性剪接来影响肿瘤相关基因的表达。已有研究表明^[7], RBM4 可促进促凋亡基因的表达, 抑制抗凋亡基因的剪接变体形成, 从而诱导肿瘤细胞凋亡。此外, RBM4 还可能通过调节细胞周期相关基因的表达来抑制肿瘤细胞增殖^[8]。在食管癌中, RBM4 表达下调可能导致这些抑癌机制的失活, 从而促进肿瘤的发生发展。

综上所述, 本研究首次证实 RBM4 在食管癌中表达下调, 且与肿瘤的恶性生物学行为和不良预后相关。RBM4 可作为食管癌预后评估的独立分子标志物, 为食管癌的精准诊疗提供新的理论依据。

项目基金: 2022 年度江苏医药职业学院附属东台医院临床专项科研项目“RBM4 在食管癌中的表达及临床意义”(2022)。

作者简介: 崔建华(1970-), 男, 江苏盐城, 学士, 东台市人民医院, 消化内科主任医师(通信作者), 研究方向: 消化系统疾病的基础与临床研究。

参考文献:

- [1]He C, Qu X, Wan J, et al. Epidemiology of esophageal cancer in 2020 and projections to 2030 and 2040[J]. Thoracic Cancer, 2023, 14(1): 3-11.
- [2]Markus M A, Yang Y H, Morris B J. Transcriptome-wide targets of alternative splicing by RBM4 and possible role in cancer[J]. Genomics, 2020, 107(4): 138-144.
- [3]Liu W, Qian K, Wei X, et al. RBM4 dictates ESCC cell fate switch from cellular senescence to glutamine-addiction survival through inhibiting LKB1-AMPK-axis[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8: 129.
- [4]Wang Y, Chen D, Qian H, et al. The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression[J]. Cancer Cell, 2024, 26(3): 374-389.
- [5]Fei T, Chen Y, Xiao T, et al. Prognostic value of decreased expression of RBM4 in human gastric cancer[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 28222.
- [6]Wang W Y, Quan W, Yang F, et al. RBM4 modulates the proliferation and expression of inflammatory factors via the alternative splicing of regulatory factors in HeLa cells[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2020, 295(1): 95-106.
- [7]Lin J C, Tsao M F, Lin Y J. Nuclear Aurora kinase A switches m6A reader YTHDC1 to enhance an oncogenic RNA splicing of tumor suppressor RBM4[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2022, 7: 97.
- [8]Yong H, Zhao W, Zhou X, et al. RNA-Binding Motif 4 (RBM4) Suppresses Tumor Growth and Metastasis in Human Gastric Cancer[J]. Medical Science Monitor, 2020, 25:4025-4034.

Expression and Clinical Significance of RBM4 in Esophageal Cancer Tissues

Cui Jianhua¹, Chen Chong¹, Zhou Yang²

1. Department of Gastroenterology, Dongtai People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224200;
2. Medical College, Jiangsu Pharmaceutical Vocational College, Yancheng, Jiangsu 224005

Objective: To investigate the expression and clinical significance of RBM4 in esophageal cancer tissues. Methods: RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of RBM4 in cancer and adjacent tissues, normal esophageal epithelial cells, and esophageal cancer cells. Immunohistochemical staining was used to detect and compare the positive expression rate of RBM4 in esophageal cancer tissues and adjacent normal tissues, and to analyze the correlation between RBM4 positive expression and clinicopathological characteristics of patients. Results: Compared with normal esophageal epithelial cell line Het-1A, the mRNA and protein levels of RBM4 in five esophageal cancer cell lines were significantly lower. The positive rates of RBM4 in adjacent tissues and cancer tissues were 72.6% (77/106) and 36.8% (39/106), respectively. RBM4 expression was correlated with tumor size, differentiation degree, and T stage

($P < 0.05$). Compared with patients in the RBM4-negative group, patients in the RBM4-positive group had significantly better OS and DFS. Cox survival analysis showed that negative RBM4 expression was an independent risk factor affecting OS and DFS in esophageal cancer patients. Conclusion: RBM4 expression is significantly reduced in esophageal cancer tissues, and its expression is negatively correlated with lymph node metastasis, clinical stage, and tumor size in esophageal cancer patients. It can serve as a reliable indicator for judging patient prognosis.

Key words: Esophageal cancer; RNA-binding motif protein 4; Prognosis; Clinical characteristics