

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.013

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.013>

## 核糖核酸结合蛋白 15 在肝细胞癌术后预后评估中的价值

金日明<sup>1</sup>, 王贵阳<sup>1</sup>, 张小兵<sup>1</sup>, 蔡权宇<sup>2</sup>

(中国人民解放军海军军医大学第三附属医院 1. 肝外一科; 2. 放射科, 上海 200438)

**[摘要]** 目的: 研究核糖核酸结合蛋白15(RNA binding motif protein 15, RBM15)的表达水平在肝细胞癌术后预后评估中的价值。方法: 回顾性收集中国人民解放军海军军医大学第三附属医院行肝细胞癌切除术的组织标本253例, 制备组织芯片, 行免疫组织化学染色, 检测RBM15蛋白表达水平。结果: 肝癌组织中的表达相比对应癌旁肝组织显著降低( $n=29$ ,  $P=0.0208$ )。RBM15蛋白表达越高则术后生存时间越短, 术后复发时间也越短(RBM15高表达组的平均生存时间和平均复发时间分别为53.2个月和37.2个月, RBM15低表达组为58.1个月和47.1个月,  $P$ 分别为0.011和0.017)。结论: 肝细胞癌组织中RBM15蛋白的表达与肝细胞癌术后生存和复发相关, 可作为肝细胞癌患者术后生存和肿瘤复发的预测指标。

**[关键词]** 肝细胞癌; RBM15蛋白; 术后复发; 预后

## Prognostic value of RNA binding Motif protein 15 in hepatocellular carcinoma

JIN Riming<sup>1</sup>, WANG Guiyang<sup>1</sup>, ZHANG Xiaobing<sup>1</sup>, CAI Quanyu<sup>2</sup>

(1. First Department of Surgery; 2. Department of Radiology, Eastern Hepatobiliary Hospital, The Nary Military Medical University, Shanghai 200438, China)

**Abstract** **Objective:** To study the expression level of RNA binding motif protein 15 (RBM15) and its value in evaluating the prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC) after operation. **Methods:** A total of 253 specimens of hepatocellular carcinoma resected in our hospital were retrospectively collected to prepare tissue microarrays. Immunohistochemical staining was performed to detect the expression of RBM15 protein. **Results:** The expression in HCC tissues was significantly lower than that in corresponding adjacent liver tissues ( $n=29$ ,  $P=0.0208$ ). The higher the expression of RBM15, the shorter the survival time and the shorter the recurrence time (53.2 months and 37.2 months in the high expression group, 58.1 months and 47.1 months in the low expression group,  $P$  values were 0.011 and 0.017, respectively). **Conclusion:** The high expression of RBM15 protein in hepatocellular carcinoma tissues is related to the survival and recurrence of hepatocellular carcinoma after operation. It can be used as a predictor of survival and recurrence of hepatocellular carcinoma after operation.

**Keywords** hepatocellular carcinoma; RBM15 protein; postoperative recurrence; prognosis

收稿日期 (Date of reception): 2019-09-09

通信作者 (Corresponding author): 蔡权宇, Email: ehbshr@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的原发性肝癌,是第六大常见肿瘤和第三大常见肿瘤相关的死亡原因<sup>[1]</sup>。中国的HCC总数和死亡人数约占全球的50%<sup>[2-3]</sup>。尽管HCC切除术作为一种常规治疗方案显著提高了患者的生存率<sup>[4]</sup>,但HCC的5年生存率并未显著提高。因此,对HCC患者的术后生存和复发进行高或低风险分组,可为临床医生选择合理的治疗策略和采用个性化治疗提供指导<sup>[5]</sup>。RBM15是一种RNA结合蛋白,通过调控Notch和Wnt等多种信号通路,在细胞特别是血细胞的生长和凋亡中起重要作用。越来越多的证据表明:RBM15可能对各种血液疾病的发展起关键作用,如急性/慢性髓细胞白血病和卡波西肉瘤<sup>[6]</sup>。实体肿瘤中的RBM15鲜见报道。本研究首次报道RBM15在HCC中表达降低,而HCC组织中的RBM15表达越高,预后越差,可作为HCC患者术后生存和肿瘤复发的预测指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例和诊断标准

随机选择2005至2011年在中国人民解放军海军军医大学第三附属医院行HCC根治性切除术的282例标本,甲醛溶液固定、石蜡包埋组织(formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE),制备组织芯片。其中29例制备具有配对癌旁肝组织的组织芯片,另253例HCC组织制备另外一套组织芯片作为随访组,随访至2014年12月。利用FFPE组织样品制备苏木精-伊红(HE)染色切片,由两位有经验的肝脏病理医生阅片。本研究已经获得中国人民解放军海军军医大学第三附属医院医学伦理委员会批准(审批号: EHBHKY2014-03-006)。纳入标准:1)诊断符合中国抗癌协会肝癌专业委员会2001年制定的“原发性肝癌的临床诊断与分期标准”<sup>[7]</sup>;2)患者未接受术前抗癌治疗,没有肝外转移证据;3)随访数据完整。获得所有患者或患者家属的书面知情同意。

### 1.2 随访

生存期(overall survival, OS)定义为HCC切除手术至死亡或最后一次观察时间点。复发(time to recurrent, TTR)定义为从HCC手术切除至发现肿瘤复发或最后一次观察时间点。计算机断层扫描或磁共振成像检查和AFP升高(>20 ng/mL)作为确定复发病例的标准。患者术后第1年每3个月随访

1次,术后第2年以及此后每6个月随访1次,直至2014年12月。由不知晓本研究的两位医生负责随访。肝癌分期采用AJCC/UICC的TNM分期(第7版)<sup>[8]</sup>。

### 1.3 组织芯片和免疫组织化学法检测

组织芯片构建参考Chen等<sup>[5]</sup>的方法。首先所有样本制备HE切片,并由病理医生进行阅片,标记后,用于构建组织芯片。用直径1 mm的圆柱形组织筒从每个标记的蜡块中取组织放入预制备蜡模块中。4 μm厚度切片放在涂有3-氨丙基三乙氧基硅烷的载玻片上。利用二甲苯10 min脱蜡2次,100%,95%和85%梯度乙醇各脱水5 min。在pH=6的柠檬酸缓冲液中煮沸10 min后在室温下冷却60 min进行抗原修复。PBS冲洗2次后经3%过氧化氢/PBS缓冲液灭活内源性过氧化物酶。利用山羊血清进行非特异性结合位点封闭。

一抗稀释如下:小鼠抗RBM15单克隆抗体(66059-1-Ig,武汉proteintech公司;1:100稀释,细胞核/细胞质染色)。二抗显色系统采用EnVision检测试剂盒[gk500705:基因科技(上海)有限公司]。显色完毕后,复染5 min。阴性对照以PBS替代一抗,步骤相同。积分光密度(IOD)测量参考文献<sup>[5]</sup>。成像系统采用宁波江丰生物信息技术有限公司的扫描仪KF-PRO-005-EX。用Image Pro Plus 6.0软件测量IOD和组织面积(美国Media Cybernetics公司)。最终RBM蛋白表达强度的单位为IOD/μm<sup>2</sup>,并利用X-Tile软件得出最佳cutoff值。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行数据分析。RBM15在HCC和对应癌旁肝组织中的表达差异的比较采用Mann-Whitney检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。生存分析采用Kaplan-Meier法进行。采用单因素Cox分析和多因素Cox比例风险回归模型(向前,有条件似然比)确定独立风险因子。

## 2 结果

### 2.1 RBM15在癌旁肝组织及HCC中的表达谱特征

RBM15在癌旁肝组织和HCC中的细胞定位为细胞核及细胞质。在HCC中的表达较相应癌旁肝组织降低( $n=29$ ),29例中,HCC中的表达相比于对应癌旁肝组织降低的有19例(65.5%),增高的有10例(34.5%,图1)。

X-tile分析253例HCC组织中的RBM15蛋白表达水平, 分为高表达组( $n=145$ )和低表达组( $n=108$ ), 再经卡方分析显示: RBM15表达与性别、年龄、HBsAg、血清AFP、肝硬化、TNM分期、Child-Pugh分级、肿瘤大小、肿瘤个数及肿瘤分化不相关, 但与血管侵犯相关( $P=0.047$ , 表1)。

## 2.2 HCC 组织 RBM15 表达高则提示预后差

Kaplan-Meier分析显示: RBM15蛋白表达越高则术后生存时间越短, 术后复发时间也越短。RBM15高表达组的生存时间和复发时间分别为53.2个月和37.2个月, 而RBM15低表达组的生存时间和复发时间分别为58.1个月和47.1个月(分别 $P=0.011$ ,  $0.017$ ; 图2)。

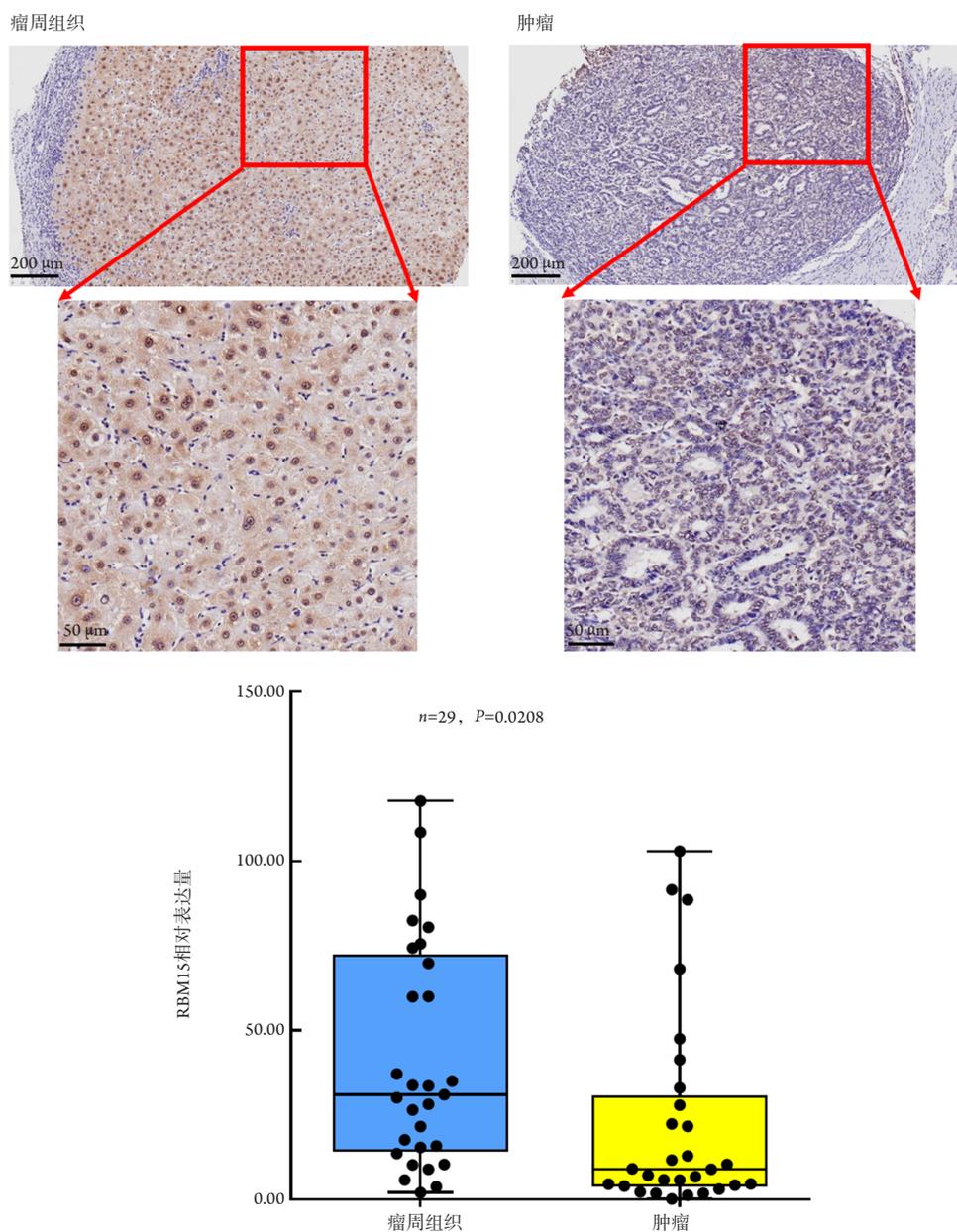


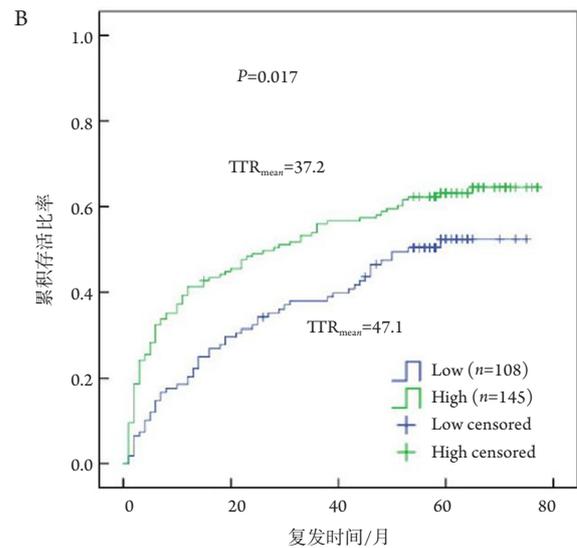
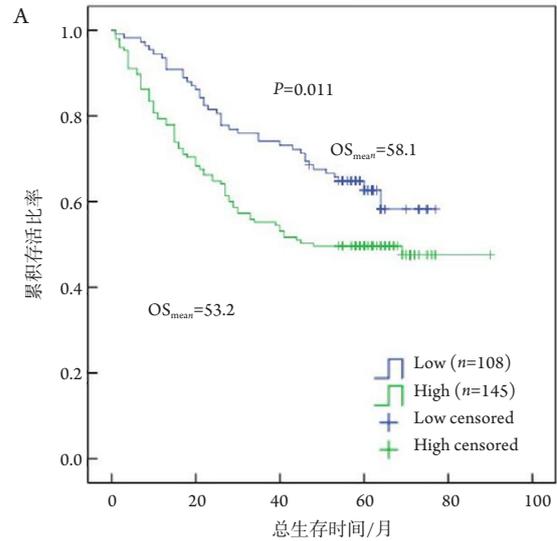
图1 RBM15在肝细胞癌和癌旁肝组织中的表达(RBM15免疫染色,  $\times 200$ )

Figure 1 RBM15 expression on HCC and peritumoral tissue (RBM15 immune staining,  $\times 200$ )

表1 RBM15蛋白表达与临床病理学特征的关系

Table 1 Correlation between RBM15 expression level and clinicopathological parameters of HCC

变量	RBM15表达		P
	低	高	
性别			0.573
男	95	124	
女	13	21	
年龄/岁			0.299
≤50	48	74	
>50	60	71	
HBsAg			0.682
阴性	13	20	
阳性	95	125	
血清AFP/(ng·mL <sup>-1</sup> )			0.359
≤20	41	47	
>50	67	98	
肝硬化			0.264
有	40	44	
无	68	101	
TNM			0.504
I	40	44	
II	56	81	
III~IV	12	20	
Child-Pugh分级			0.365
A	101	131	
B	7	14	
肿瘤大小/cm			0.198
≤5	58	66	
>5	50	79	
肿瘤数量			0.706
单发	87	114	
多发	21	31	
分化程度			0.410
高分化	12	13	
中分化	96	130	
低分化	0	2	
血管侵犯			0.047
无	49	48	
有	59	97	

图2 RBM15高表达组和低表达组的生存时间(A)和复发时间(B)  
Figure 2 OS (A) and TTR (B) of RBM15 high and low groups

### 2.3 HCC 组织 RBM15 表达可作为独立的生存预测因子

单因素Cox分析表明：血清AFP、肝硬化、TNM分期、肿瘤大小、肿瘤个数、血管侵犯、RBM15是术后生存的预后因素；HBsAg、血清AFP、肝硬化、TNM分期、肿瘤大小、肿瘤个数、肿瘤分化、血管侵犯、RBM15是术后复发的预后因素。多因素Cox风险比例模型分析提示：血清AFP、肝硬化、肿瘤大小、肿瘤个数、血管侵犯、RBM15是术后生存的独立预后因子；而肝硬化、肿瘤大小、肿瘤个数是术后复发的独立预后因素(表2)。

表2 HCC患者生存分析结果

Table2 COX regression analysis of patients with HCC

变量	OS				TTR			
	单变量 量P	多变量			单变量 量P	多变量		
		HR	95% CI	P		HR	95%CI	P
性别(男 vs 女)	0.145				0.614			
年龄(≤50岁 vs >50岁)	0.790				0.996			
HBsAg(阳性 vs 阴性)	0.076				0.022			
血清AFP(≤20 ng/mL vs >20 ng/mL)	0.001	0.1641	1.057~2.550	0.027	0.002			
肝硬化(有vs无)	0.016	0.1674	1.084~2.588	0.020	0.003	1.896	1.304~2.757	0.001
TNM (I vs II vs III-IV)	0.0001				0.0001			
Child-Pugh (A vs B)	0.466				0.510			
肿瘤大小(≤5 cm vs >5 cm)	0.0001	2.622	1.740~3.951	0.0001	0.0001	2.243	1.599~3.146	0.0001
肿瘤数量(单发vs多发)	0.0001	1.876	1.249~2.817	0.002	0.0001	2.036	1.414~2.930	0.0001
分化程度(高 vs 中 vs 低)	0.061				0.029			
血管侵犯(无 vs 有)	0.010				0.019			
RBM15(低 vs 高)	0.013	1.562	1.057~2.307	0.025	0.019			

### 3 讨论

作为RNA结合蛋白, RBM15可调控Notch, Wnt等重要信号通路, 对血细胞的生长和凋亡具有重要作用<sup>[6]</sup>。近年的研究<sup>[9]</sup>发现: 血液病以外的疾病如叶状肿瘤的RBM15突变可能在交界性及恶性叶状肿瘤的发病机制中起重要作用, Kaposi's肉瘤的RBM15在尿嘧啶-DNA糖基化酶RNA的积累和蛋白质翻译中起重要作用<sup>[10]</sup>。除了疾病状态, Xiao等<sup>[11]</sup>通过敲除RBM15的造血干细胞, 可以发生与衰老相似的诸多生理变化。而RBM15在实体肿瘤中的表达水平的变化, 与临床病理参数及预后的关系未见报道。本文首次发现HCC中的RBM15表达比癌旁组织降低, HCC组织中的RBM15表达越高, 预后越差, 可作为HCC患者术后生存和肿瘤复发的预测指标。

一般来讲, 肿瘤标志物在肿瘤组织中表达水平越低预后越差<sup>[12-13]</sup>。肿瘤标志物的表达水平与患者预后的关系呈多样性。Pan等<sup>[14]</sup>发现: 与癌旁肝组织相比, 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican 3, GPC3)在HCC中显著高表达, 而GPC3表达高的患者预后更好。Peng等<sup>[15]</sup>的研究结果也提示: 在结直肠癌患者肿瘤组织中冠层2同源物(canopy 2, CNPY2)亚型2的表达较肿瘤邻近正常

组织增加, 但低表达CNPY2亚型2患者的5年总生存率显著低于高表达CNPY2亚型2患者。本研究显示: 在RBM15在肝癌组织中的表达普遍低于癌旁肝组织, 但生存分析发现HCC中RBM15表达高的患者比表达低的患者预后更差。这表明RBM15可能在HCC的发生和发展的不同阶段起不同的作用。

因本研究目的是观察RBM15在癌旁肝组织和HCC中的表达特征及其表达与预后之间关系的首次探索, 未能探讨RBM15表达水平对肝癌细胞株肿瘤生物学行为的影响, 而这部分我们将在接下来的研究中探讨。

综上, 本研究首次报告RBM15在HCC中表达普遍较癌旁肝组织降低, 而HCC组织中的RBM15表达越高的患者预后越差, 细胞癌组织中RBM15蛋白的表达与肝细胞癌术后生存和复发相关, 可作为肝细胞癌患者术后生存和肿瘤复发的预测指标。

### 参考文献

1. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1245-1255.
2. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J].

- CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
  4. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314.
  5. Chen KJ, Jin RM, Shi CC, et al. The prognostic value of Niemann-Pick C1-like protein 1 and Niemann-Pick disease type C2 in hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer, 2018, 9(3): 556-563.
  6. Hu M, Yang Y, Ji Z, et al. RBM15 functions in blood diseases[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2016, 16(7): 579-585.
  7. 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准[J]. 实用癌症杂志, 2001, 16(6): 672.  
Chinese Society of Liver Cancer. Clinical diagnosis and staging criteria of primary liver cancer[J]. The Practical Journal of Cancer, 2001, 16(6): 672.
  8. Chun YH, Kim SU, Park JY, et al. Prognostic value of the 7th edition of the AJCC staging system as a clinical staging system in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(17): 2568-2575.
  9. Garcia-Dios DA, Levi D, Shah V, et al. MED12, TERT promoter and RBM15 mutations in primary and recurrent phyllodes tumours[J]. Br J Cancer, 2018, 118(2): 277-284.
  10. Massimelli MJ, Majerciak V, Kang JG, et al. Multiple regions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF59 RNA are required for its expression mediated by viral ORF57 and cellular RBM15[J]. Viruses, 2015, 7(2): 496-510.
  11. Xiao N, Jani K, Morgan K, et al. Hematopoietic stem cells lacking Ott1 display aspects associated with aging and are unable to maintain quiescence during proliferative stress[J]. Blood, 2012, 119(21): 4898-4907.
  12. Jin GZ, Zhang Y, Cong WM, et al. Phosphoglucomutase 1 inhibits hepatocellular carcinoma progression by regulating glucose trafficking[J]. PLoS Biol, 2018, 16(10): e2006483.
  13. Jin GZ, Yu WL, Dong H, et al. SUOX is a promising diagnostic and prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2013, 59(3): 510-517.
  14. Pan C, Wang X, Chen W, et al. Reevaluation of glypican-3 as a prognostic marker in HCC using X-tile software[J]. Med Oncol. 2015, 32(1): 359.
  15. Peng J, Ou Q, Guo J, et al. Expression of a novel CNPY2 isoform in colorectal cancer and its association with oncologic prognosis[J]. Aging (Albany NY), 2017, 9(11): 2334-2351.

**本文引用:** 金日明, 王贵阳, 张小兵, 蔡权宇. 核糖核酸结合蛋白15在肝细胞癌术后预后评估中的价值[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(10): 2581-2586. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.013

**Cite this article as:** JIN Riming, WANG Guiyang, ZHANG Xiaobing, CAI Quanyu. Prognostic value of RNA binding Motif protein 15 in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(10): 2581-2586. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.013