

核糖体蛋白 L23 在胶质母细胞瘤中的临床意义

范仕兵 冯清林 刘明冬 李骥

【摘要】 目的 探讨核糖体蛋白(RP)L23 在胶质母细胞瘤(GBM)中的临床意义。**方法** 以 3 个独立的 GBM 基因表达数据集 GSE42669、GSE7696 以及 GSE4290 为研究对象,分析 RPL23 基因在正常脑组织和 GBM 组织中表达的差异,RPL23 基因与 GBM 患者无进展生存期以及总生存期的关系,并运用基因探针富集分析(GSEA)法进一步探讨 RPL23 基因对 GBM 细胞增殖的作用机制。**结果** RPL23 基因在 GBM 组织中的表达低于正常脑组织($P < 0.0001$),高表达 RPL23 基因的 GBM 患者无进展生存期(Log-rank $P < 0.0001$, $HR = 5.347$, 95% CI : 2.568 ~ 11.060)、总生存期(Log-rank $P = 0.0046$, $HR = 3.372$, 95% CI : 1.680 ~ 6.767) 均优于 RPL23 低表达者。GSEA 方法结果提示 RPL23 基因可能通过 p53 信号通路、IL6-JAK-STAT3 信号通路、IL2-STAT5 信号通路、KRAS 信号通路、PI3K-AKT-mTOR 信号通路、细胞凋亡、WNT/ β -Catenin 信号通路以及 NOTCH 信号通路等生物学过程影响 GBM 细胞增殖。**结论** RPL23 可能是 GBM 患者独立的保护性因素,高表达 RPL23 基因的 GBM 患者临床预后更好。

【关键词】 胶质母细胞瘤;核糖体蛋白 L23 基因;临床预后

Clinical significance of ribosomal protein L23 in glioblastoma Fan Shibing, Feng Qinglin, Liu Mingdong, Li Ji. Department of Neurosurgery, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China
Corresponding author, Feng Qinglin, E-mail: iceman_feng_dr@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance of ribosomal protein (RP) L23 in glioblastoma (GBM). **Methods** Three independent GBM gene expression databases of GSE42669, GSE7696 and GSE4290 were employed to analyze the differential expression of RPL23 gene between GBM and normal brain tissues. The relationship between RPL23 gene and progression-free survival and overall survival of GBM patients was investigated. Gene set enrichment analysis (GSEA) was adopted to explore the mechanism underlying the effect of RPL23 gene upon GBM cell proliferation. **Results** The expression level of RPL23 gene in the GBM tissues was significantly down-regulated compared with that in the normal brain tissues ($P < 0.05$). The progression-free survival (Log-rank $P < 0.0001$, $HR = 5.347$, 95% CI : 2.568-11.060) and overall survival (Log-rank $P = 0.0046$, $HR = 3.372$, 95% CI : 1.680-6.767) in GBM patients with high expression levels of RPL23 gene were significantly longer than those in their counterparts with low expression levels of RPL23. GSEA results prompted that RPL23 gene might affect the GBM cell proliferation probably through p53, IL6-JAK-STAT3, IL2-STAT5, KRAS, PI3K-AKT-mTOR, WNT/ β -Catenin and NOTCH signaling pathways, cellular apoptosis and alternative biological processes. **Conclusions** RPL23 is probably an independent protective factor for GBM patients. GBM patients with high expression levels of RPL23 gene obtain better clinical prognosis than their counterparts with low expression levels of RPL23.

【Key words】 Glioblastoma; Ribosomal protein L23 gene; Clinical prognosis

脑胶质瘤是最常见的颅内恶性肿瘤,其中以胶质母细胞瘤(GBM)最为常见,约占胶质瘤的50%^[1-4]。由于GBM具有较强的侵袭性,极易对周围组织造成损伤,传统的治疗手段难以有效杀死全部肿瘤细胞,当前GBM具有较高的致死率和复发

率,即使是经历最大范围的手术安全切除了肿瘤,且术后采用经典的STUPP方案行替莫唑胺同步放射及化学治疗后的GBM患者,其中位生存期也仅为14.6个月,而5年生存率则仅为9.8%^[5-7]。近年来,随着分子生物学技术的研究进展,GBM的

治疗逐渐迈入分子靶向治疗阶段^[8-9]。核糖体蛋白(RP) L23 定位于核仁,其 mRNA 包含 5 个外显子,位于人类 17 号常染色体,分子量为 15 kD。有研究报道,RPL23 在多种肿瘤中异常表达^[11]。另有研究报道 RPL23 的高表达能够抑制胃癌细胞的增殖,并有望成为胃癌靶向治疗的分子靶点^[12]。然而笔者见目前尚无研究报道 RPL23 对 GBM 细胞作用机制,因此分析了 GBM 基因表达数据集,探讨 RPL23 在 GBM 中的临床意义。

对象与方法

一、研究对象

在基因表达综合数据库(GEO)下载 GBM 患者基因表达数据集 GSE42669、GSE7696 以及 GSE4290^[13-16]。各基因表达数据集的情况如下,GSE42669:采用 Affymetrix 公司的 HuGene-1_0-st 基因表达芯片对 58 例 GBM 患者的临床样本进行基因表达谱检测,该数据集提供了 55 例 GBM 患者生存的信息^[13]。GSE7696:采用了 HG-U133_Plus_2 基因表达芯片对 80 例 GBM 患者及 4 例正常对照者的脑组织(医学伦理审查资料由原作者提供,下同)进行基因表达谱检测,该数据集提供了 80 例 GBM 患者的生存信息^[14-15]。GSE4290:采用了 Affymetrix 公司的 HG-U133_Plus_2 基因芯片,并采用“Affy”程序包进行预处理,得到 GBM 和正常脑组织中 HG-U133_Plus_2 探针集中所有基因的相对表达值水平,该数据集提供了 77 份 GBM 样本和 23 份正常脑组织的基因表达谱数据^[16]。

二、方 法

使用上述 3 个基因表达数据集分析 RPL23 在 GBM 和正常脑组织中的表达情况,探讨 RPL23 基因表达与 GBM 临床预后的相关性,同时研究其可能的作用机制。具体步骤如下,首先分析 RPL23(探针号:200888_s_at)在 GSE4290 中的 GBM 临

床样本和正常脑组织中的表达情况。以 RPL23(探针号:8014749)在 GSE42669 所有样本中表达水平的中位数将该数据集中的 GBM 样本分为 RPL23 高表达组和 RPL23 低表达组,分析 2 组患者无进展生存期及总生存期的差异。同样的根据 RPL23 在 GSE7696 中表达水平的中位数,将该数据集中的 GBM 样本分为 RPL23 高表达组与 RPL23 低表达组,以基因探针富集分析(GSEA)官网的 MsigDB 数据库中下载的 hallmark 基因集作为参考基因集,置换次数为 1 000 次,以 $P < 0.05$ 、错误发现率(FDR) < 0.25 ,使用 GSEA 法分析 RPL23 基因对 GBM 细胞增殖可能的作用机制。

三、统计学处理

采用 SPSS 21.0 处理统计学数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 Log-rank 法对 RPL23 高表达和 RPL23 低表达组 GBM 患者的无进展生存期和总生存期进行分析,并运用 Graphpad 5.0 软件绘制相应的生存曲线;使用两独立样本 t 检验比较 RPL23 基因在 GBM 组织和正常脑组织中表达的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、GBM 和正常脑组织 RPL23 表达的比较

分析 GSE4290 表明,RPL23 基因在 GBM 中的相对表达值为 $7\,607.0 \pm 1\,699.3$,低于正常脑组织中的相对表达值 $13\,380.0 \pm 4\,014.1$ ($t = 6.703$, $P < 0.001$)。

二、RPL23 高表达组和 RPL23 低表达组 GBM 患者预后的比较

分析 GSE42669 表明,RPL23 高表达组无进展生存期优于 RPL23 低表达组 ($P < 0.0001$),见图 1A;RPL23 高表达组的总生存期优于 RPL23 低表达组 ($P = 0.0046$),见图 1B。

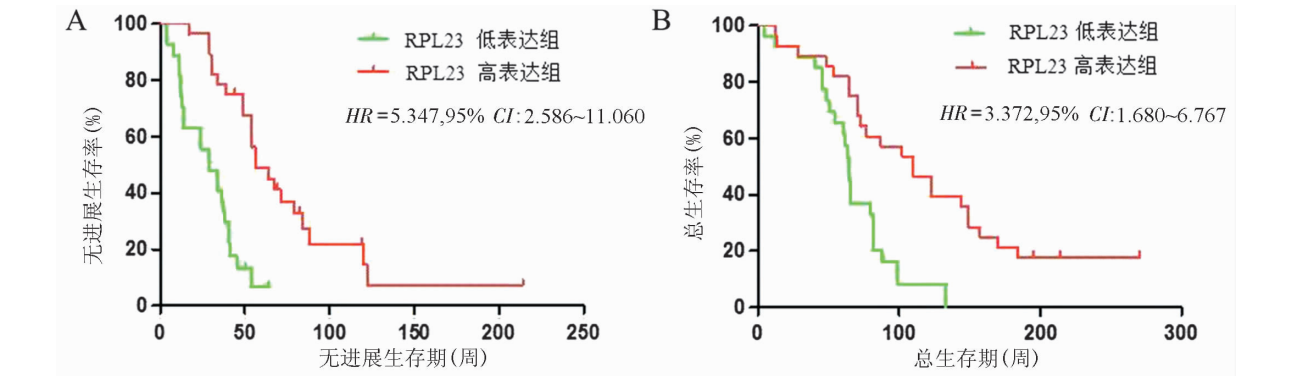


图1 GSE42669 中 RPL23 高表达组和 RPL23 低表达组 GBM 患者预后比较

三、RPL23 基因对 GBM 细胞增殖的作用

GSEA 法分析结果示，RPL23 低表达组主要富集了 p53 信号通路、IL6-JAK-STAT3 信号通路、IL2-STAT5 信号通路、KRAS 信号通路、PI3K-AKT-表 1

SEA 法分析结果

名 称	富集评分	校正后富集评分	名义 P 值	错误发现率 q 值
p53 信号通路	0.574528	1.921578	0.004107	0.059455
IL6-JAK-STAT3 信号通路	-0.42141	-1.58878	0.008097	0.130275
IL2-STAT5 信号通路	0.522246	1.567878	0.014000	0.098173
KRAS 信号通路	0.594293	1.725790	0.019194	0.054821
PI3K-AKT-mTOR 信号通路	0.560380	1.658535	0.025341	0.076490
细胞凋亡	0.472017	1.622870	0.037624	0.090281
WNT/ β -catenin 信号通路	0.685241	1.596578	0.038536	0.096978
NOTCH 信号通路	0.481846	1.566707	0.043478	0.091139

讨 论

如前所述，GBM 是中枢神经系统常见的恶性肿瘤之一，GBM 患者的临床预后极差。目前亟待开发 GBM 的靶向治疗及诊断危险分层策略。本研究通过再次挖掘已经公开发表的 3 个独立 GBM 基因表达数据集，明确 RPL23 基因在 GBM 细胞中明显低于其相应的正常组织，高表达 RPL23 的 GBM 患者临床预后（无进展生存期及总生存期）明显优于 RPL23 低表达患者。基于 RPL23 低表达的 GBM 的 GSEA 结果表明 RPL23 基因可能通过 p53 信号通路、IL6-JAK-STAT3 信号通路、IL2-STAT5 信号通路、KRAS 信号通路、PI3K-AKT-mTOR 信号通路、细胞凋亡、WNT/ β -catenin 信号通路以及 NOTCH 信号通路影响 GBM 细胞增殖，进而影响 GBM 患者的临床预后。

事实上，目前已经有多篇报道提示 RPL23 参与多种肿瘤细胞的增殖。Meng 等^[17]的动物实验表明，RPL23 的表达依赖于 mTOR 的功能，并介导 p53 通路相关的肿瘤抑制作用。Zhang 等^[18]的研究也表明，在胃癌细胞中 RPL23 通过抑制 p53-MDM2 相互作用关系而维持 p53 作用，以发挥诱导细胞周期阻滞和凋亡的抗肿瘤作用。另一方面，Zhang 等^[19]的研究表明，RPL23 协同去折叠蛋白反应（unfolded protein response）参与 p53 依赖的细胞周期阻滞。我们的研究结果表明，低表达 RPL23 基因的 GBM 临床样本主要富集在 p53 相关信号通路，提示在 GBM 细胞中，RPL23 基因的低表达可能通

mTOR 信号通路、细胞凋亡、WNT/ β -catenin 信号通路以及 NOTCH 信号通路，提示 RPL23 可能通过以上信号通路或生物学过程影响 GBM 细胞增殖，影响 GBM 患者临床预后，见表 1。

过调节 p53 相关信号通路而抑制肿瘤细胞。Wu 等^[20]的研究表明骨髓增生异常综合征患者的肿瘤细胞 RPL23 的高表达与其凋亡抑制密切相关，高表达 RPL23 患者临床预后更差。因此，对于本研究来说，RPL23 基因对 GBM 的具体作用机制，尚有待进一步的分子生物学实验验证。

p53 基因已经参与体内多种肿瘤的发生和发展。DNA 损伤、遗传毒性、癌基因激活、细胞间联系缺失、低氧以及异常增殖通路等多种癌变诱因均能够诱导 p53 基因激活^[21]。Lee 等^[22]证明 Znf179 能够通过 p53 依赖的细胞周期途径诱导多形性成胶质细胞瘤细胞生长停滞并分化。Quan 等^[23]的研究表明，抑制 p53 下游分子 PI3K 能够促进 GBM 细胞增殖并预示着患者不良预后。Clark 等^[24]的研究也表明，在 GBM 细胞中白藜芦醇靶向 p53 基因，诱导 p53 基因的表达与激活，并促进其下游分子的转录，进而发挥白藜芦醇抑制 GBM 细胞增殖和浸润的作用。由此可见，使用药物靶向激活 p53 或者下调 p53 的表达能够分别抑制或促进 GBM 细胞的增殖，并影响 GBM 患者的临床预后。我们的研究表明，低表达 RPL23 的 GBM 临床样本主要富集 p53 等多种信号通路或生物学过程，提示 RPL23 基因可能通过 p53 相关通路影响 GBM 细胞的增殖，但是具体的作用机制有待进一步证实。以上分析表明，RPL23 可能为 GBM 患者的独立保护性因素。

参 考 文 献

[1] Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. Handb Clin

- Neurol, 2016, 134: 381-397.
- [2] McFaline-Figueroa JR, Wen PY. The viral connection to glioblastoma. *Curr Infect Dis Rep*, 2017, 19 (2): 5.
- [3] Li QJ, Cai JQ, Liu CY. Evolving molecular genetics of glioblastoma. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129 (4): 464-471.
- [4] 丁德智, 侯现增, 刘广存. 复发性胶质母细胞瘤的研究进展. *新医学*, 2016, 47 (12): 797-802.
- [5] Wen PY, Jiang T, Schiff D. How can we develop therapies for glioblastoma more efficiently? Randomized versus single-arm studies. *Neuro Oncol*, 2017, 19 (4): 459-460.
- [6] Roth P, Gramatzki D, Weller M. Management of elderly patients with glioblastoma. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2017, 17 (4): 35.
- [7] Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek G, Kaspera W. Diagnostic and therapeutic biomarkers in glioblastoma: current status and future perspectives. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 8013575.
- [8] Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest*, 2017, 127 (2): 415-426.
- [9] Tivnan A, Heilinger T, Lavelle EC, Prehn JH. Advances in immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol*, 2017, 131 (1): 1-9.
- [10] Ting YH, Lu TJ, Johnson AW, Shie JT, Chen BR, Kumar SS, Lo KY. Bcp1 is the nuclear chaperone of Rpl23 in *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2017, 292 (2): 585-596.
- [11] Berchtold MW, Berger MC. Isolation and analysis of a human cDNA highly homologous to the yeast gene encoding L17A ribosomal protein. *Gene*, 1991, 102 (2): 283-288.
- [12] Russo N, Wang X, Liu M, Banerjee R, Goto M, Scanlon C, Metwally T, Inglehart RC, Tsodikov A, Duffy S, Van Tubergen E, Bradford C, Carey T, Wolf G, Chinnaiyan AM, D'Silva NJ. A novel approach to biomarker discovery in head and neck cancer using an autoantibody signature. *Oncogene*, 2013, 32 (42): 5026-5037.
- [13] Joo KM, Kim J, Jin J, Kim M, Seol HJ, Muradov J, Yang H, Choi YL, Park WY, Kong DS, Lee JI, Ko YH, Woo HG, Lee J, Kim S, Nam DH. Patient-specific orthotopic glioblastoma xenograft models recapitulate the histopathology and biology of human glioblastomas in situ. *Cell Rep*, 2013, 3 (1): 260-273.
- [14] Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, de Tribolet N, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MC, Hainfellner JA, Heppner FL, Dietrich PY, Zimmer Y, Cairncross JG, Janzer RC, Domany E, Delorenzi M, Stupp R, Hegi ME. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol*, 2008, 26 (18): 3015-3024.
- [15] Lambiv WL, Vassallo I, Delorenzi M, Shay T, Diserens AC, Misra A, Feuerstein B, Murat A, Migliavacca E, Hamou MF, Sciuscio D, Burger R, Domany E, Stupp R, Hegi ME. The Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) is targeted in glioblastoma and has a tumor suppressing function potentially by induction of senescence. *Neuro Oncol*, 2011, 13 (7): 736-747.
- [16] Sun L, Hui AM, Su Q, Vortmeyer A, Kotliarov Y, Pastorino S, Passaniti A, Menon J, Walling J, Bailey R, Rosenblum M, Mikkelsen T, Fine HA. Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell*, 2006, 9 (4): 287-300.
- [17] Meng X, Tackmann NR, Liu S, Yang J, Dong J, Wu C, Cox AD, Zhang Y. RPL23 links oncogenic RAS signaling to p53-mediated tumor suppression. *Cancer Res*, 2016, 76 (17): 5030-5039.
- [18] Zhang YF, Zhang BC, Zhang AR, Wu TT, Liu J, Yu LF, Wang WX, Gao JF, Fang DC, Rao ZG. Co-transduction of ribosomal protein L23 enhances the therapeutic efficacy of adenoviral-mediated p53 gene transfer in human gastric cancer. *Oncol Rep*, 2013, 30 (4): 1989-1995.
- [19] Zhang Y, Shi Y, Li X, Du W, Luo G, Gou Y, Wang X, Guo X, Liu J, Ding J, Wu K, Fan D. Inhibition of the p53-MDM2 interaction by adenovirus delivery of ribosomal protein L23 stabilizes p53 and induces cell cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *J Gene Med*, 2010, 12 (2): 147-156.
- [20] Wu L, Li X, Xu F, Chang C, He Q, Zhang Z, Zhang Y. Overexpression of RPL23 in myelodysplastic syndromes is associated with apoptosis resistance of CD34⁺ cells and predicts poor prognosis and distinct response to CHG chemotherapy or decitabine. *Ann Hematol*, 2012, 91 (10): 1547-1554.
- [21] England B, Huang T, Karsy M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biol*, 2013, 34 (4): 2063-2074.
- [22] Lee KH, Chen CL, Lee YC, Kao TJ, Chen KY, Fang CY, Chang WC, Chiang YH, Huang CC. Znf179 induces differentiation and growth arrest of human primary glioblastoma multiforme in a p53-dependent cell cycle pathway. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 4787.
- [23] Quan J, Li Y, Jin M, Chen D, Yin X, Jin M. Suppression of p53-inducible gene 3 is significant for glioblastoma progression and predicts poor patient prognosis. *Tumour Biol*, 2017, 39 (3): 1010428317694572.
- [24] Clark PA, Bhattacharya S, Elmayan A, Darjatmoko SR, Thuro BA, Yan MB, van Ginkel PR, Polans AS, Kuo JS. Resveratrol targeting of AKT and p53 in glioblastoma and glioblastoma stem-like cells to suppress growth and infiltration. *J Neurosurg*, 2017, 126 (5): 1448-1460.

(收稿日期: 2017-04-25)

(本文编辑: 洪悦民)