

RNA结合蛋白RBM6的研究进展

荆昕涛^{1,2} 陈妍珂^{1,2} 黄辰^{1,2*}

(¹西安交通大学医学部基础医学院细胞生物学与遗传学系, 西安 710061;

²西安交通大学环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 西安 710061)

摘要 RBM6(RNA binding motif protein 6)是一种RNA结合蛋白, 存在5种可变剪接体。以往的研究发现: 与正常组织相比, 这些剪接体在肺癌和乳腺癌等肿瘤组织中的表达均有显著变化, 但其功能尚不清楚。越来越多的研究显示, RBM6可能是肿瘤进展中的一个重要的调控因子。该文将从RBM6的基因与蛋白结构、作用机制以及与疾病的关系三个方面对RBM6的研究进展进行总结。

关键词 RNA结合蛋白; RBM6; 肿瘤; 可变剪接体

Research Progress of RNA Binding Motif Protein RBM6

JING Xintao^{1,2}, CHEN Yanke^{1,2}, HUANG Chen^{1,2*}

(¹Department of Cell Biology and Genetics, Basic Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

²Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases, Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract RBM6 is a type of RNA binding protein with five splice variants. Previous researchs have found that compared with the normal tissues, the expression of these splices in tumor tissues, such as lung cancer and breast cancer, has significantly changed. However, their function is still unclear. Besides, more and more studies have shown that RBM6 may be considered as an important regulator in tumor progression. This review summarizes the research progress of RBM6 from three aspects: gene and protein structure, mechanisms, and the relationship with diseases.

Keywords RNA binding protein; RBM6; tumor; splice variants

RNA结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)是一类与RNA相互作用的蛋白质, 包含特定的RNA结合结构域, 通过与靶RNA结合形成核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)复合物发挥调控基因表达的功能^[1]。RBP对结合的靶RNA的作用是多方面的, 影响其剪接、修饰、运输、定位、稳定性、降解和翻译^[2]。以往的研究发现, RBP的表达异常和功能失调与一些疾病发生密切相关。例如胰岛素样生长因子2 mRNA结

合蛋白1(insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1, IMP1)的缺失会促进结肠肿瘤微环境的发生发展^[3]。而肝癌中负延长因子E(negative elongation factor E, NELFE)拷贝数增加会导致MYC信号通路过度激活, 促进肝癌进展^[4]等。

RBM6是一种RNA结合蛋白, 属于RBM家族。该家族成员由HUGO基因命名委员会命名, 均含有RNA识别基序(RNA-recognition motif, RRM)、RNA

收稿日期: 2020-09-01 接受日期: 2020-12-07

陕西省国际科技合作与交流计划面上项目(批准号: 2017KW-059)和陕西省科技资源开放共享平台项目(批准号: 2018PT-09)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13193377051, E-mail: hchen@xjtu.edu.cn

Received: September 1, 2020 Accepted: December 7, 2020

This work was supported by the Projects of International Cooperation and Exchanges Natural Science Foundation of Shaanxi Province of China (Grant No.2017KW-059), and the Scientific Research and Sharing Platform Construction Project of Shaanxi Province (Grant No.2018PT-09)

*Corresponding author. Tel: +86-13193377051, E-mail: hchen@xjtu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5470>

结合基序(RNA-binding motif, RBM)以及核蛋白基序(ribonucleoprotein motif, RNP)^[5]。近年的研究显示, *RBM6*的异常表达和不同剪切方式与一些疾病的发生和进展密切相关。本文就*RBM6*的相关研究报道进行综述分析。

1 *RBM6*的基因与蛋白结构

1.1 *RBM6*基因的发现与定位

1999年, *RBM6*由DRABKIN等^[6]通过定位克隆从小细胞肺癌纯合缺失区3p21.3分离得到, 被克隆并命名为*NY-LU-12*^[7]。该基因全长约137 Kb, 由20个外显子和21个内含子组成^[8]。*RBM6*与*RBM5*基因相邻, 并靠近端粒^[8]。两者氨基酸序列有30%的同源性, 推测*RBM6*可能源自*RBM5*的基因复制和重定位^[9]。根据细胞遗传缺失分析、杂合性缺失研究和基因转染实验的结果, 染色体3p21.3位点可能是一种广谱肿瘤抑制基因的位置^[10], 提示*RBM6*在细胞中可能发挥抑癌基因的作用。

1.2 *RBM6*的可变剪接体及表达

在真核细胞, 由DNA转录而来的pre-mRNA(前体RNA)需要通过剪接内含子和外显子等加工过程才能成为成熟的RNA, 而pre-mRNA存在不止一种剪接方式, 因此, 同一种基因可能有不同的RNA可变剪接体。据文献报道, *RBM6*有5种可变剪接体, 如图1所示, 分别是剪接体*RBM6A*、*RBM6B*、*RBM6C*、*RBM6D*和*RBM6Δ5*^[5]。肺癌中存在以上5种剪接体。在正常乳腺组织、乳腺癌组织以及乳腺癌细胞系MDA-MB-231中只存在*RBM6A*和*RBM6Δ5*两种剪接体, 且*RBM6A*剪接体在乳腺癌组织中的表达水平

显著高于其在正常乳腺组织中^[11]。

1.2.1 *RBM6A* *RBM6A*包含20个外显子, 是*RBM6*转录本的主要存在形式(图1)^[5]。DRABKIN^[6]及HOTFINDER等^[12]利用Northern blot分析发现, *RBM6A*转录本的丰度在成人的不同组织中具有差异性, 在胸腺、淋巴结和外周血细胞中丰度最高, 在心脏、胰腺和骨骼肌中丰度较高, 在粒细胞中随着其分化程度加深而丰度下降, 提示剪接体*RBM6A*可能对T细胞和粒细胞的分化及功能具有重要作用。

1.2.2 *RBM6B* 转录本*RBM6B*是在剪接体*RBM6A*序列的145 nt处插入一个208 bp外显子的剪接体。由于额外序列的插入, 原始的开放阅读框(open reading frame, ORF)被打乱, 翻译无法在原有的起始密码子AUG处起始, 但在插入的外显子中发现了新的潜在的翻译起始位点, 该剪接体在肺癌细胞中含量较低^[7]。

1.2.3 *RBM6C*和*RBM6D* 与剪接体*RBM6B*相似, 剪接体*RBM6C*和*RBM6D*均在剪接体*RBM6A*序列的145 nt处插入额外的外显子^[7]。*RBM6C*的插入片段包含两个串联的外显子, 长364 bp; 而*RBM6D*则只包含其中一个长137 bp的外显子^[7]。这些外显子的插入破坏了原始的ORF, 导致*RBM6D* 5'端形成较长的UTR区^[7]。

1.2.4 *RBM6Δ5* 转录本*RBM6Δ5*的cDNA最初被克隆为*g16*, 该剪接体缺失了5号外显子^[7]。TIMMER等^[9]的研究发现, *RBM6Δ5*在正常肺组织、肺癌组织以及肺癌细胞中均有表达, 但其在正常肺组织中的表达远高于肺癌细胞。另外, GURE等^[7]的研究发现,

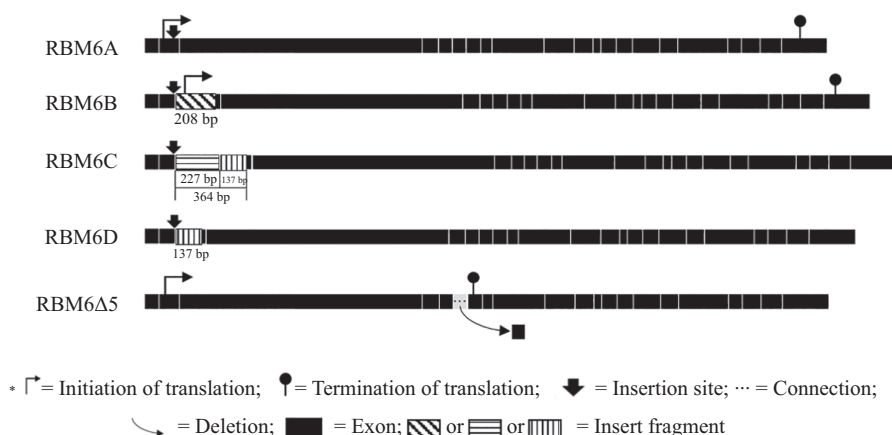


图1 *RBM6*剪接体示意图(根据参考文献[11]修改)

Fig.1 Schematic diagram of *RBM6* spliceosome (modified from reference [11])

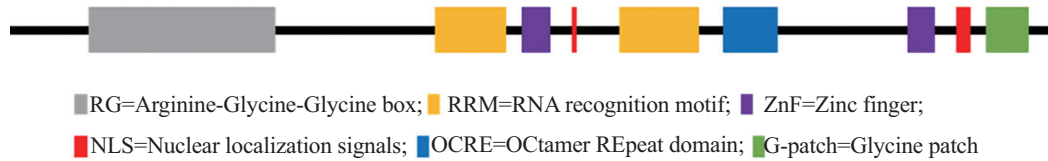


图2 RBM6蛋白结构示意图

Fig.2 Schematic diagram of RBM6 protein structure

NY-LU-12表达的蛋白质也即转录本RBM6A的翻译产物是肺癌患者的一种自体血清抗原。这些发现表明, RBM6Δ5可能与肺癌的发生具有相关性。

1.2.5 RBM6-RBM5嵌合转录物 WANG及其同事^[8]发现了3种RBM6-RBM5嵌合转录物, 但均不编码融合蛋白, 在肿瘤样本和非肿瘤样本中存在差异转录, 而且嵌合转录物的丰度与乳腺肿瘤的大小呈正相关, 这提示RBM6-RBM5嵌合转录可能是一种潜在的肿瘤分化标志物。

1.3 RBM6蛋白的结构及表达

RBM6基因虽然有5种RNA转录剪接形式, 但并非每种转录本都能翻译蛋白且发挥生物学功能。比如剪接体RBM6C和RBM6D, 由于额外片段的插入使得两者5'端产生较长的UTR区, 导致转录本的翻译过程受阻, 细胞内检测不到对应的蛋白质^[7]。

剪接体RBM6A的cDNA长度为3 591 bp, ORF(nt 102-3 470)编码由1 123个氨基酸残基组成的蛋白质, 分子质量为129 kDa^[7]。mRNA 5'端有长度为101 bp的UTR区, 3'端有长度为129 bp的UTR区^[7]。RBM6A定位在细胞核中^[13], 该蛋白含有与RNA代谢和pre-RNA剪接功能相关的特定结构域, 如图2所示, 包括精氨酸-甘氨酸-甘氨酸基序RG盒子(arginine-glycine-glycine box)、RRM、锌指结构(zinc finger, ZnF)、核定位信号(nuclear localization signals, NLS)、八聚体重复区(octamer repeat domain, OCRE)和甘氨酸区(Glycine patch, G-patch)^[14]。

剪接体RBM6B在细胞中的含量极低, 由于额外片段的插入, 转录本RBM6B发生移码突变, 编码包含1 177个氨基酸的蛋白质^[7]。与RBM6A不同的是, RBM6B NH₂端有由69个氨基酸残基组成的信号肽序列^[7]。

剪接体RBM6Δ5由于5号外显子的缺失, 导致ORF改变, 翻译过程提前终止, 最终编码出的蛋白质只包含520个氨基酸, 分子量大约为59 kDa^[7]。

综上所述, 在研究RBM6蛋白功能时主要考虑

RBM6A和RBM6Δ5两种剪接体。而现有的文献中, 除非特殊说明, 指的都是由RBM6A编码的蛋白质^[5]。

2 RBM6的作用机制

2.1 RBM6调控靶基因的可变剪接

HEATH^[15]研究了RBM6在非洲爪蟾卵母细胞中的分布, 发现RBM6局限分布在细胞核的灯刷染色体和染色质颗粒聚集区; RBM6伴随RNA聚合酶II分布, 可能具有协同转录的作用, 也可能以类似于剪接阻碍因子hnRNP的作用参与转录后调控; 在哺乳动物细胞中转染GFP标记的RBM6和截短体蛋白, 发现RBM6的N-端多聚化结构域对它的核内亚定位是必需的。

BECHARA等^[13]利用CLIP-Seq调查了RBM5、RBM6和RBM10在肺癌细胞中结合的靶RNA, 发现这三者都与NUMB基因的RNA结合。他们发现, 肺癌细胞中突变的RBM10错误调控NUMB基因的可变剪接, 导致包含外显子9的NUMB转录本增加; 但低表达的RBM5和RBM6又会造成NUMB基因转录过程外显子9的跳跃, 最终导致包含外显子9的NUMB剪接体增加, 激活Notch信号通路, 引起细胞过度增殖。与此同时, 他们发现RBM6结合靶RNA的核心序列为CUCUGAA。

2.2 RBM6与靶mRNA结合增加其稳定性

DAI等^[16]发现, 混合谱系激酶域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like, MLKL)与RBM6相互作用可增加细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和内皮选择素(endothelial selectin, E-selectin)分子mRNA的稳定性。

2.3 RBM6与CSF1R基因融合促进白血病细胞增殖

有研究发现, 在急性巨核细胞白血病细胞系MKPL-1中RBM6和CSF1R基因融合表达, 激活了CSF1R激酶, 从而引起细胞过度增殖^[17]。乳腺癌中发现RBM6-RBM5的嵌合转录本, 且其丰度与乳腺

肿瘤大小成呈相关^[8]。

3 RBM6与疾病的相关性研究

3.1 RBM6与肿瘤的相关性

3.1.1 RBM6的促癌作用 目前关于RBM6在肿瘤中的功能研究并不多,已有的研究结果显示,在肺癌、胰腺癌和结肠癌中RBM6表现出促癌因子的作用^[13,17-19]。

BECHARA等^[13]发现,RBM6的缺失会致使HeLa细胞的克隆形成能力显著下降。此外他们的研究显示,RBM家族成员5、6和10在肺癌组织异常表达:RBM5和RBM6低表达,RBM10发生突变。通过转染过表达RBM5和RBM6,肺癌细胞增殖能力增强。

DUAN等^[18]利用质谱技术分析患者组织样本,发现与健康对照样本相比,胰腺癌患者的血清中RBM6的上调超过2.6倍,免疫组化结果也显示,胰腺癌组织中RBM6显著高表达,提示RBM6可能由胰腺癌细胞产生并释放到血液中,可作为胰腺癌早期诊断的潜在生物标志物。

GU等^[17]发现,在急性巨核细胞白血病细胞系MKPL-1中存在RBM6-CSF1R的融合蛋白,该融合蛋白会促进MKPL-1细胞的增殖,可能是巨核细胞白血病的诱因之一。

通过对结直肠癌患者的组织标本检测发现^[19],RBM6在癌组织中的表达高于与其配对的癌旁组织,与患者的临床分期和肿瘤的远端转移呈正相关,RBM6的高表达也与结直肠癌患者的不良预后相关。

3.1.2 RBM6的抑癌作用 由于不同癌症类型间存在差异,同一蛋白可能表现出两面性。尽管RBM6在肺癌、胰腺癌和结肠癌中发挥促癌因子的作用,但在喉癌和膀胱癌中,RBM6却表现出抑癌因子的作用^[20-23]。喉癌中,过表达RBM6会下调促迁移侵袭蛋白,上调促凋亡蛋白,抑制细胞增殖^[22],并降低表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)和磷酸化的细胞外调节蛋白激酶(phospho-Erk, p-ERK)在体内外的表达水平^[23]。在膀胱尿路上皮癌中,RBM6表现出抗增殖以及促进细胞凋亡的作用^[21]。

3.2 RBM6与其他疾病的相关性研究

3.2.1 RBM6参与炎症诱导的细胞坏死 MLKL是

参与细胞坏死过程的一个末端执行者。DAI等^[16]的研究发现,在急性炎症模型小鼠中,血管内皮细胞的MLKL通过与RBM6结合稳定特异性的mRNA,促进ICAM-1、VCAM-1和E-selectin表达,招募白细胞黏附到内皮,诱导细胞坏死,加剧炎症反应。该研究提示,RBM6可能参与炎症诱导的细胞坏死。

3.2.2 RBM6是寿命相关基因 瑞士的MCDAID等^[24]通过基因组序列分析与人寿命相关的基因和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)序列,发现人脑RBM6的表达水平与寿命呈显著负相关。进一步,他们分析小鼠前额叶皮层RBM6的表达水平,也证实RBM6低表达的老鼠具有更长的寿命。该研究提示,RBM6可能是一个寿命相关生物标记物。

4 结语和展望

肺癌细胞中几乎不翻译蛋白质的剪接体RBM6C和RBM6D可能是无用的转录“噪音”,或者作为长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在肺癌细胞中发挥作用。另外,RBM6的5种剪接体在不同的细胞中存在种类及丰度差异,表现出了细胞或组织特异性。

RBM5和RBM6都存在可变剪接体,转录本RBM5Δ6剪切掉外显子6,转录本RBM6Δ5剪切掉外显子5,这些被剪切掉的外显子序列都包含RRM及RNP的核心序列^[5],这提示被剪接掉的产物可能有潜在的功能,然而这一猜想还需要进一步的研究证实。

以往研究已报道多种RBM蛋白,如RBM4、RBM5、RBM6、RBM7和RBM8等在RNA的可变剪接中具有重要的作用^[5]。BECHARA等^[13]的研究证实,RBM6在肺癌细胞中参与NUMB的剪接,而HEATH等^[15]的研究发现,在非洲爪蟾卵母细胞中,RBM6发挥剪接阻碍因子的作用参与转录后调控,这提示RBM6对基因的转录后表达具有多重调控作用。

目前,针对RBM6的研究还非常有限,多数研究都聚焦在RBM6A,但鉴于RBM6A和RBM6Δ5在乳腺癌及正常乳腺组织中的表达有差异^[11],RBM6Δ5的功能还有待深入研究。此外,现有的研究显示,RBM6A在不同的肿瘤中作用各异,所以其生物学功能还有待进一步明确。

通过对Jurkat T细胞的蛋白质组分析发现,有超过10种的RNA结合蛋白的表达在Fas介导的凋亡过

程中发生了改变^[25]。RBM3和RBM5都被证明参与调节细胞凋亡过程^[5], 因此, 预测与RBM5具有同源性的RBM6也具有凋亡调节功能。以上研究提示, RBM6可能通过调控靶基因的可变剪接影响细胞凋亡。本文对RBM6的研究进展进行了简要总结, 希望能为科研工作者的后续研究提供帮助。

参考文献 (References)

- [1] WANG Z L, LI B, LUO Y X, et al. Comprehensive genomic characterization of rna-binding proteins across human cancers [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(1): 286-98.
- [2] DREYFUSS G, KIM V N, KATAOKA N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(3): 195-205.
- [3] HAMILTON K E, CHATTERJI P, LUNDSMITH E T, et al. Loss of stromal IMP1 promotes a tumorigenic microenvironment in the colon [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(11): 1478-86.
- [4] DANG H, TAKAI A, FORGUES M, et al. Oncogenic activation of the RNA binding protein nelfe and MYC signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(1): 101-14.
- [5] SUTHERLAND L C, RINTALA-MAKI N D, WHITE R D, et al. RNA binding motif (RBM) proteins: a novel family of apoptosis modulators [J]? *J Cell Biochem*, 2005, 94(1): 5-24.
- [6] DRABKIN H A, WEST J D, HOTFILDER M, et al. DEF-3(g16/NY-LU-12), an RNA binding protein from the 3p21.3 homozygous deletion region in SCLC [J]. *Oncogene*, 1999, 18(16): 2589-97.
- [7] GURE A O, ALTORKI N K, STOCKERT E, et al. Human lung cancer antigens recognized by autologous antibodies: definition of a novel cDNA derived from the tumor suppressor gene locus on chromosome 3p21.3 [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(5): 1034-41.
- [8] WANG K, UBRIACO G, SUTHERLAND L C. RBM6-RBM5 transcription-induced chimeras are differentially expressed in tumours [J]. *BMC Genomics*, 2007, doi: 10.1186/1471-2164-8-348.
- [9] TIMMER T, TERPSTRA P, ANKE V D B, et al. A comparison of genomic structures and expression patterns of two closely related flanking genes in a critical lung cancer region at 3p21.3 [J]. *Eur J Hum Genet*, 1999, 7(4): 478-86.
- [10] KOK K, NAYLOR S L, BUYS C H C M. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes [J]. *Adv Cancer Res*, 1997, 71: 27-92.
- [11] RINTALA-MAKI N D, GOARD C A, LANGDON C E, et al. Expression of RBM5-related factors in primary breast tissue [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 100(6): 1440-58.
- [12] HOTFILDER M, BAXENDALE S, CROSS M A, et al. Def-2,-3,-6 and -8, novel mouse genes differentially expressed in the haemopoietic system [J]. *Br J Haematol*, 1999, 106(2): 335-44.
- [13] BECHARA E G, SEBESTYEN E, BERNARDIS I, et al. RBM5, 6, and 10 differentially regulate NUMB alternative splicing to control cancer cell proliferation [J]. *Mol Cell*, 2013, 52(5): 720-33.
- [14] COOMER A O, BLACK F, GREYSTOKE A, et al. Alternative splicing in lung cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(11/12): 194388.
- [15] HEATH E, SABLITZKY F, MORGAN G T. Subnuclear targeting of the RNA-binding motif protein RBM6 to splicing speckles and nascent transcripts [J]. *Chromosome Res*, 2010, 18(8): 851-72.
- [16] DAI J, ZHANG C, GUO L, et al. A necroptotic-independent function of MLKL in regulating endothelial cell adhesion molecule expression [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 282.
- [17] GU T L, MERCHER T, TYNER J W, et al. A novel fusion of RBM6 to CSF1R in acute megakaryoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2007, 110(1): 323-33.
- [18] DUAN B, HU X, FAN M, et al. RNA-binding motif protein 6 is a candidate serum biomarker for pancreatic cancer [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2019, 13(5): e1900048.
- [19] 王子听, 盛伟伟, 董明, 等. 结合基序蛋白6在结直肠癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国实验诊断学*(WANG Z X, SHENG W W, DONG M, et al. The expression and clinical significance of binding motif protein 6 in colorectal cancer [J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*), 2017, 21(5): 765-9.
- [20] WANG Q, WANG F, ZHONG W, et al. RNA-binding protein RBM6 as a tumor suppressor gene represses the growth and progression in laryngocarcinoma [J]. *Gene*, 2019, doi: 10.1016/j.gene.2019.02.025. Epub 2019 Feb 15.
- [21] 杨展, 瞿长宝, 张勇, 等. RBM6通过GSK-3 β / β -catenin调节途径对膀胱尿路上皮癌细胞发挥抗增殖和促进凋亡作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*(YANG Z, ZHAI C B, ZHANG Y, et al. RBM6 exerts anti-proliferation and promoting apoptosis effects on bladder urothelial carcinoma cells through GSK-3 β / β -catenin regulation pathway [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2020, 36(8): 909-16.
- [22] 谭建成, 刘鑫国, 邢金燕, 等. RNA结合蛋白6对喉癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响[J]. *中华实验外科杂志*(TAN J C, LIU X G, XING J Y, et al. Effects of RNA binding protein 6 on the proliferation, migration and apoptosis of laryngeal carcinoma cells [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*), 2020(1): 121-3.
- [23] 彭琳, 张小平, 郑力维. RNA结合蛋白6对喉癌发生发展的调节作用及机制研究[J]. *临床和实验医学杂志*(PENG L, ZHANG X P, ZHENG L W. The regulatory effect and mechanism of RNA binding protein 6 on the development of laryngeal carcinoma [J]. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*), 2019, 18(16): 1720-4.
- [24] MCDAID A F, JOSHI P K, PORCU E, et al. Bayesian association scan reveals loci associated with human lifespan and linked biomarkers [J]. *Nat Commun*, 2017, doi: 10.1038/ncomms15842.
- [25] THIEDE B, DIMMLER C, SIEJAK F, et al. Predominant identification of RNA-binding proteins in Fas-induced apoptosis by proteome analysis [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 26044-50.