

• 基础研究 •

# RBM7在乳腺癌细胞MDA-MB-231中的表达及其对AKAP12表达的影响

石 靓<sup>1</sup>, 奚佩雯<sup>2</sup>, 吴 靓<sup>3</sup>, 张 旭<sup>1</sup>, 丁 强<sup>1\*</sup><sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院乳腺中心, <sup>2</sup>健康管理中心, <sup>3</sup>病理科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的: 探讨RNA结合蛋白7(RNA binding motif protein 7, RBM7)在人源性乳腺癌细胞MDA-MB-231中的表达, 及其对A激酶锚定蛋白12(A-kinase anchoring protein 12, AKAP12)表达的影响。方法: 在人源性乳腺癌细胞MDA-MB-231中分别转染RBM7过表达、干扰慢病毒(实验组)和相应对照慢病毒(对照组), 经嘌呤霉素筛选后获得稳定转染的细胞株, 使用荧光显微镜观察细胞转染情况。通过qRT-PCR和Western blot实验分别验证转染后细胞内RBM7的表达情况, 并观察RBM7表达改变对AKAP12表达的影响。经RNA测序(RNA-sequence, RNA-seq)获得的差异表达基因进行基因本体论(gene ontology, GO)富集分析发现受RBM7影响的差异表达基因的主要富集通路, 并结合UALCAN数据库分析AKAP12在乳腺癌中的表达情况。更进一步通过RNA结合蛋白免疫共沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)实验明确RBM7与AKAP12之间的关系。通过免疫组化在乳腺癌组织中明确RBM7表达与AKAP12表达之间的关系。结果: 在乳腺癌细胞MDA-MB-231中分别转染RBM7过表达、干扰慢病毒, 经嘌呤霉素筛选2周后, 获得RBM7过表达及干扰的稳转细胞株。经RNA-seq获得的差异表达基因进行GO富集分析发现, 受RBM7显著影响的基因主要富集在细胞周期通路, 且UALCAN数据库分析发现AKAP12在乳腺癌中低表达( $P < 0.05$ )。qRT-PCR和Western blot显示, RBM7过表达能下调AKAP12的RNA及蛋白的表达( $P < 0.05$ ), RBM7干扰后能上调AKAP12的RNA及蛋白表达( $P < 0.05$ )。RIP实验显示, RBM7能直接结合AKAP12 mRNA从而发挥其对AKAP12的调节作用( $P < 0.05$ )。免疫组化结果表明, 在人乳腺癌组织中RBM7表达与AKAP12表达呈显著负性关联( $P < 0.05$ )。结论: RBM7在乳腺癌细胞(MDA-MB-231)和乳腺癌组织中下调AKAP12的表达。

**[关键词]** 乳腺癌; RNA结合蛋白7; A激酶锚定蛋白12; 细胞周期**[中图分类号]** R737.9**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2025)12-1766-09**doi:** 10.7655/NYDXBNSN250949

## The expression of RBM7 in breast cancer cell MDA-MB-231 and its effects on AKAP12 expression

SHI Liang<sup>1</sup>, XI Peiwen<sup>2</sup>, WU Jing<sup>3</sup>, ZHANG Xu<sup>1</sup>, DING Qiang<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Breast Disease Center, <sup>2</sup>Health Management Center, <sup>3</sup>Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of RNA binding motif protein 7 (RBM7) in human breast cancer cell MDA-MB-231, and its effects on the expression of A-kinase anchoring protein 12 (AKAP12). **Methods:** MDA-MB-231 cells were transfected with lentiviruses for RBM7 overexpression, knockdown (experimental group) and the corresponding control lentivirus (control group) respectively. Stable transfected cell lines were selected with puromycin and verified *via* fluorescence microscopy. The expression of RBM7 after transfection was verified by qRT-PCR and Western blot experiments, respectively, and the effect of RBM7 expression change on AKAP12 expression was observed. Gene ontology (GO) enrichment analysis was performed on the differentially expressed genes obtained by RNA-sequence, and revealed significantly enriched pathways regulated by RBM7. At the same time, the UALCAN database was employed to assess AKAP12 expression in breast cancer. The relationship between RBM7 and AKAP12 was studied by RNA binding protein immunoprecipitation (RIP) assays. Furthermore, immunohistochemical analysis was performed to delineate the

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82372770, 82403190)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: dingqiang@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0003-1499-6200)

relationship between RBM7 and AKAP12 in breast cancer tissues. **Results:** After transfecting MDA-MB-231 breast cancer cells with lentiviruses for RBM7 overexpression and knockdown respectively and screening with puromycin for 2 weeks, stably transfected cell lines with RBM7 overexpression and knockdown were obtained. GO enrichment analysis of differentially expressed genes obtained by RNA-sequence revealed that the genes significantly affected by RBM7 were mainly enriched in the cell cycle pathway. Moreover, the UALCAN database analysis showed that AKAP12 was lowly expressed in breast cancer ( $P < 0.05$ ). It was observed that overexpression of RBM7 could downregulate RNA and protein expression of AKAP12, and knockdown of RBM7 upregulated RNA and protein expression of AKAP12 *via* qRT-PCR and Western blot ( $P < 0.05$ ). RIP assays revealed that RBM7 could directly bind to mRNA of AKAP12 ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemical analysis also showed that there was a significant negative correlation between the expression of RBM7 and AKAP12 in human breast cancer tissues ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** RBM7 downregulates the expression of AKAP12 in breast cancer cell MDA-MB-231 and breast cancer tissues.

[Key words] breast cancer; RNA binding motif protein 7; A kinase anchoring protein 12; cell cycle

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(12): 1766-1774]

RNA结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)作为基因表达调控的核心元件,精细调控RNA剪接、修饰、稳定性、转运和翻译等关键生物学过程,贯穿RNA从产生到降解的整个生命周期<sup>[1-2]</sup>。其表达异常和功能失调与肿瘤的发生发展密切相关,涉及多种人类疾病,如乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌等<sup>[3-4]</sup>。其中, RNA结合蛋白7(RNA binding motif protein 7, RBM7)是RNA结合蛋白家族中的重要成员之一<sup>[4]</sup>。既往研究显示, RBM7是人源性核酸外切酶体靶向(human nuclear exosome targeting, NEXT)复合物的核心亚基,在锌指蛋白(zinc finger CCHC-type containing 8, ZCCHC8)的框架结构之下,与RNA解螺旋酶MTR4两者相互作用,利用RBM7的特定识别基序(RNA recognition motif, RRM)直接结合到靶mRNA的poly-U序列上,从而在NEXT复合物中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。课题组前期研究发现,在乳腺癌中, RBM7主要通过结合下游靶基因CDK1 mRNA的3'端非编码区(3'-untranslated region, 3'-UTR)的AU富含区(AU-rich element, ARE),从而提高CDK1的mRNA稳定性并发挥促癌作用;同时, RBM7在人乳腺癌细胞BT474中通过结合P21的mRNA下调P21的表达,诱导细胞周期停滞在S期,从而加速整个细胞周期的进程<sup>[7-8]</sup>。值得注意的是, 2020年Yu等<sup>[9]</sup>发现在结直肠癌中RNA结合蛋白家族其他成员RBMS1通过结合A激酶锚定蛋白12(A-kinase anchoring protein 12, AKAP12)3'-UTR的ARE,从而稳定AKAP12的mRNA。然而,与RBP作用靶点密切相关的AKAP12在乳腺癌中的具体作用机制目前尚无报道。

AKAP12也称Src抑制的蛋白激酶C的底物(Src suppressed C kinase substrate, SSeCK),作为A

激酶锚定蛋白家族成员之一,是细胞周期过程中一种重要的有丝分裂负调节剂<sup>[10-11]</sup>。最新研究显示,在三阴性乳腺癌的肿瘤微环境中,肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)作为关键的基质细胞,可通过其自身表达的AKAP12激活白细胞介素(interleukin, IL)-34-CSF1R信号轴,从而驱动巨噬细胞M2极化,最终形成免疫抑制微环境并促进肿瘤进展,该过程与乳腺癌患者不良预后显著相关<sup>[12]</sup>。目前,在乳腺癌中的研究多聚焦于AKAP12如何抑制异常免疫反应,发挥抑癌作用;但上述CAF相关研究仅提示AKAP12的免疫调控功能可能具有细胞类型或微环境依赖性。然而, AKAP12在乳腺癌中的具体作用机制,特别是RBP与AKAP12的相互作用是否参与其功能调控,尚无明确阐释。

本研究通过将RBM7基因稳定转入人源性乳腺癌细胞株MDA-MB-231中,并成功构建RBM7过表达及干扰细胞株。经RNA-seq分析发现,受RBM7影响的差异基因主要富集在细胞周期通路,且本课题组前期研究发现RBM7过表达能加速乳腺癌细胞周期进程,加速细胞分裂<sup>[7]</sup>。经UALCAN数据库分析发现AKAP12在乳腺癌中低表达;更进一步研究发现,在乳腺癌细胞中RBM7能够负调节AKAP12的表达,且经免疫组化检测发现RBM7与AKAP12在乳腺癌组织中的表达亦呈负相关。深入机制研究发现, RBM7能与AKAP12的mRNA直接结合并发挥其生物学作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人源性乳腺癌细胞株MDA-MB-231(ATCC细胞

库,美国),由江苏省人民医院龙江院区中心实验室保存。胰蛋白酶消化液(上海 Beyotime 公司); DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovin serum, FBS)(上海 Wisent 公司);慢病毒及相关转染试剂(上海吉玛制药技术有限公司); RNA Trizol、PrimeScript RT Reagent 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 试剂(TaKaRa 公司,日本);兔抗人 $\beta$ -actin 多克隆抗体、兔抗人 RBM7 多克隆抗体(21896-1-AP)、兔抗人 AKAP12 多克隆抗体(25199-1-AP)(武汉 Proteintech 公司);增强型化学发光试剂(ECL)蛋白印迹底物(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合溶液(北京兰杰柯科技有限公司);polybrene(上海吉玛制药技术公司);RIP 试剂盒(Millipore 公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养与转染

MDA-MB-231 细胞株培养于含 10%FBS、1%青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合溶液的 DMEM 培养液,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,当细胞生长至对数生长期,融合至 70%左右时,用胰酶消化细胞,每孔 2×10<sup>5</sup> 个细胞铺入 6 孔板中,待细胞贴壁 24 h 后进行转染,参照慢病毒转染试剂说明书分别设过表达 RBM7 的实验组(RBM7)和对照组(NC),干扰 RBM7 的实验组(Sh-1 和 Sh-2)和对照组(SCR),每孔分别加入对应体积的慢病毒和 2  $\mu$ L polybrene,混匀后将 6 孔板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

### 1.2.2 筛选细胞株

本研究设计的 RBM7 慢病毒载体携带嘌呤霉素抗性基因,乳腺癌细胞 MDA-MB-231 感染慢病毒 48 h 后换为含 1  $\mu$ g/ $\mu$ L 嘌呤霉素的完全培养基开始筛选,嘌呤霉素浓度逐步加至 5  $\mu$ g/mL,通过荧光显微镜观察其绿色 GFP 荧光情况,只有转染并整合 RBM7 慢病毒的细胞能表达嘌呤霉素抗性蛋白,可在含嘌呤霉素的培养基中存活,经这种方法可以逐步淘汰未成功感染 RBM7 慢病毒的细胞,2 周后获得稳定表达的抗性克隆细胞株并保种、传代。

### 1.2.3 qRT-PCR 检测 mRNA 表达

取对数生长期的细胞,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,Prime Script RT Master Mix Perfect Real time 合成 cDNA(37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 延伸)。使用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂,反应体系 20  $\mu$ L, SYBR 10  $\mu$ L,前后引物 10  $\mu$ mol/L 各 0.8  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L,灭菌蒸馏水 6  $\mu$ L,ROX 0.4  $\mu$ L。反应条件:预变性 95 °C 30 s,变性 95 °C 5 s,退火 60 °C 30 s,共 40 个循环,Step One Plus<sup>TM</sup> Real-time PCR System。计算

2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  值为 RBM7 和 AKAP12 基因的相对表达量。内参  $\beta$ -actin 下游引物序列:5'-TCACCCACACTGT-GCCCATCTACGA-3',上游引物序列:5'-CAGCG-GAACCGCTCATTGCCAATGG-3';RBM7 下游引物序列:5'-CAGAGACAAGCAGTGATGAACAG-3',上游引物序列:5'-TTGATCCAGAGGTGAAGAACCAA-3';AKAP12 下游引物序列:5'-TGTC AAGCCGAAA-CCTTAGC-3',上游引物序列:5'-GTACCAGATGC-GACCTCATT-3'。

### 1.2.4 Western blot 检测蛋白表达

按照蛋白提取试剂盒说明书要求提取待测细胞的总蛋白,根据上清液体积向 EP 管内加入适量 SDS 蛋白上样缓冲液,100 °C 水浴煮 8 min,冷切后放置 -20 °C 冰箱保存。根据 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒说明书制作 SDS-PAGE 凝胶,4 °C 湿润保存。蛋白样品加至 SDS-PAGE 凝胶,设置电源参数为恒压 80 V 电泳 2 h,后根据目的蛋白分子大小切割条带,设置电源参数为恒定 250 mA 冰浴下转膜至 PVDF 上,摇床快速封液室温封闭 2 min,分别与一抗 RBM7(1:1 000)、AKAP12(1:1 000)和  $\beta$ -actin(1:2 000)在 4 °C 摇床内孵育过夜, TBST 清洗 3 次,每次 10 min,兔二抗(1:5 000)室温孵育 2 h, TBST 清洗 3 次,每次 10 min。滴加 ECL 化学发光液于暗室中显影、曝光。使用 Image J 软件进行定量分析。

### 1.2.5 免疫组化(immunohistochemistry, IHC)检测人乳腺癌组织中 RBM7 和 AKAP12 蛋白的表达

本研究使用的所有乳腺癌组织均来自 2020 年南京医科大学第一附属医院乳腺中心收治的乳腺癌患者 24 例,年龄 33~80 岁,平均 49.45 岁。纳入标准:①经穿刺活检或手术病理检查证实为乳腺癌;②既往无乳腺癌病史及其他严重基础疾病;③患者及患者家属能够理解研究流程,自愿加入本研究,签署知情同意书,依从性好,配合随访。排除标准:①男性乳腺癌、炎性乳腺癌,妊娠期或哺乳期乳腺癌;②临床资料不完善;③合并其他恶性肿瘤或近 5 年内曾患除乳腺癌之外的恶性肿瘤;④合并非恶性肿瘤的严重疾病,影响患者的依从性或使患者处于危险状态;⑤痴呆、智力异常或任何妨碍对知情同意书理解的精神疾病。本研究中乳腺癌标本的获取和使用均经过南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准(2025-SR-790)。取手术切除的乳腺癌组织标本(直径为 0.5 cm 左右的组织块),以 4% 甲醛溶液固定 24 h,石蜡包埋后切片。成片后分别滴加 RBM7(1:200)和 AKAP12 抗体(1:200),4 °C 孵育

过夜, PBS 缓冲液冲洗3次, 加兔二抗, 室温下孵育20~30 min, PBS 冲洗3次。二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色后充分冲洗, 苏强度评分和阳性细胞比例评分之积。着色强度评分标准: 0分未染色, 1分浅棕色, 2分棕色, 3分深棕色。阳性细胞比例评分标准: 0分无阳性细胞, 1分阳性细胞比例 $\leq 10\%$ , 2分阳性细胞比例11%~50%, 3分阳性细胞比例51%~80%, 4分阳性细胞比例为81%~100%。

### 1.2.6 转录组分析

利用 Illumina HiSeq 4000 平台进行转录组 RNA 测序, 通过 Tophat2 工具 soft(v2.1.0) 将读数与参考基因组作图。由 DESeq(1.10.1) 发现的调整后的  $P < 0.05$  的基因 ( $\log_2FC > 2$ ) 被指定为差异表达。使用 R 包 clusterProfiler 实现对差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)在特定基因本体论(gene ontology, GO)富集显著性的量化评估。

### 1.2.7 RNA 结合蛋白免疫共沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)

将人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 ( $2 \times 10^7$  个) 用 RNA 免疫沉淀裂解缓冲液裂解, 离心取上清, 在  $4^\circ\text{C}$  下分别与  $5 \mu\text{g}$  抗兔 RBM7 抗体和抗兔非特异性 IgG 摇床孵育过夜。待抗体与 RNA 以及磁珠结合后, 对沉淀下来的复合物进行 RNA 纯化。之后, 将纯化的 RNA 进行 qRT-PCR、RT-PCR 及琼脂糖电泳实验。

### 1.3 统计学方法

应用 GraphPad Prism 10 统计软件分析, 所有数值

变量均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )的形式进行描述性统计, 以准确反映数据的集中趋势和变异程度。对于符合正态分布且方差齐性的两组均数比较使用两组独立样本  $t$  检验; 使用方差分析比较多组间均数差异。实验均重复3次,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

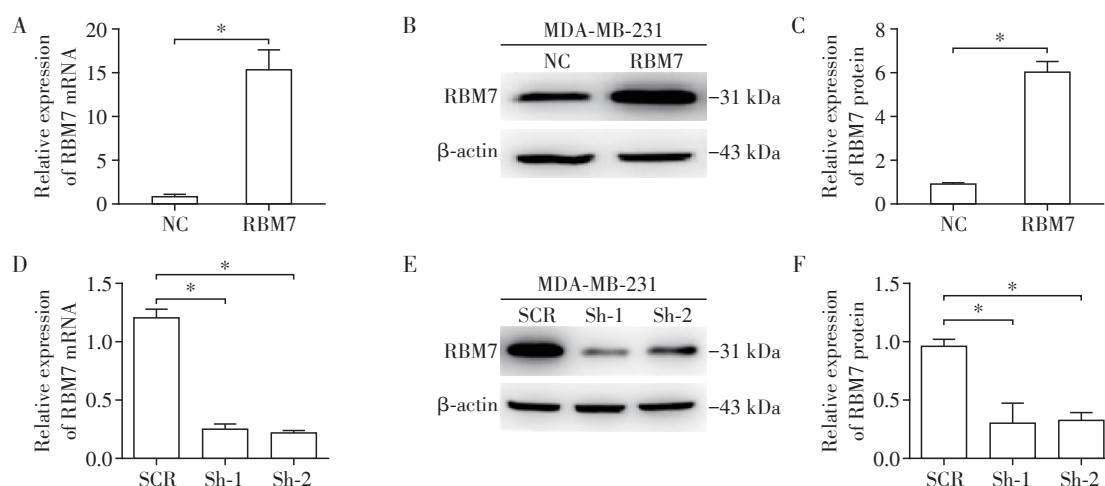
## 2 结果

### 2.1 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中构建稳定的 RBM7 过表达及干扰细胞株

通过 qRT-PCR 和 Western blot 实验发现, 在过表达 RBM7 的实验组(RBM7)和对照组(NC)中, 与对照组相比, 实验组 RBM7 的 mRNA 和蛋白表达水平明显增高, 差异有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ , 图 1A~C); 同时, 在干扰 RBM7 的实验组(Sh-1 和 Sh-2)和对照组(SCR)中, 实验组 RBM7 的 RNA 和蛋白表达水平明显下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1D~F), 筛选出的稳转细胞株用于后续实验。

### 2.2 高通量测序检测发现 RBM7 主要富集通路

本课题组前期研究将已构建的 RBM7 过表达组(RBM7)和相应对照组(NC)的乳腺癌细胞提取 RNA 并进行 RNA-seq 检测, 发现可能受 RBM7 表达改变影响的基因和通路<sup>[7]</sup>。进一步经 GO 分析发现, 受 RBM7 影响的显著表达的基因主要富集在细胞周期这一通路中(图 2A)。因此, 猜想受 RBM7 影响的显著差异表达的基因可能在细胞周期过程中发挥重要作用。



A: The overexpression of RBM7 regulated RNA expression of RBM7 in breast cancer cell MDA-MB-231 via qRT-PCR ( $n=3$ ,  $^*P < 0.05$ ). B, C: The overexpression of RBM7 regulated protein expression of RBM7 in breast cancer cell MDA-MB-231 via Western blot ( $n=3$ ,  $^*P < 0.05$ ). D: The knockdown of RBM7 regulated RNA expression of RBM7 in breast cancer cell MDA-MB-231 via qRT-PCR ( $n=3$ ,  $^*P < 0.05$ ). E, F: The knockdown of RBM7 regulated protein expression of RBM7 in breast cancer cell MDA-MB-231 via Western blot ( $n=3$ ,  $^*P < 0.05$ ).

图1 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 RBM7 过表达效率及干扰效率的验证

Figure 1 The validation of RBM7 overexpression and knockdown in breast cancer cell MDA-MB-231

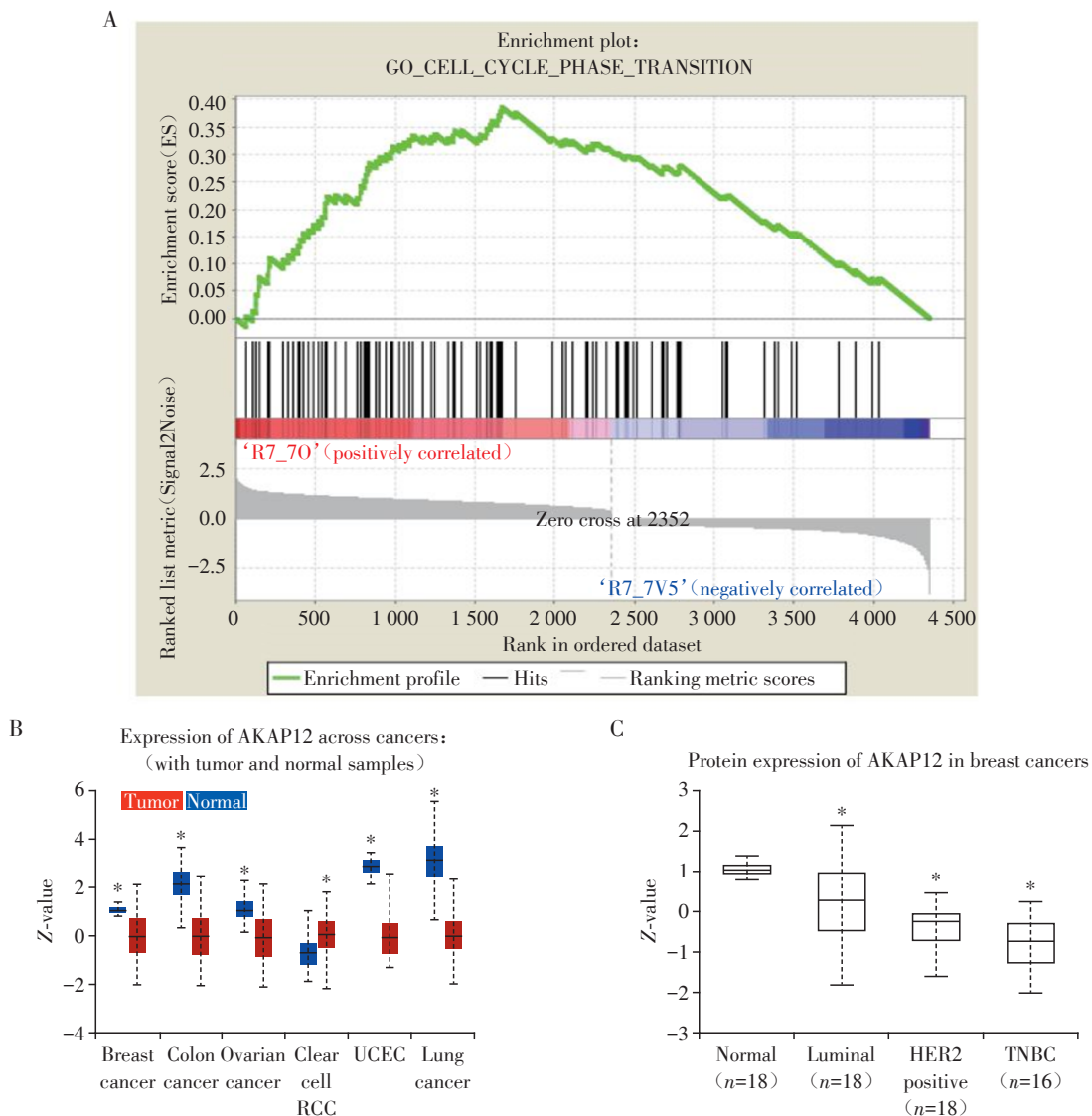
2.3 数据库分析发现 AKAP12 在乳腺癌组织中低表达

经 UALCAN 数据库 (<https://ualcan.path.uab.edu>) 分析发现 AKAP12 在乳腺癌、结肠癌、卵巢癌和透明细胞肾细胞癌中呈低表达,而在子宫内膜癌 (uterine confined endometrial cancer, UCEC) 中呈高表达 ( $P < 0.05$ , 图 2B); 在乳腺癌中,按分子分型分为 Luminal 型、人类表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 阳性和三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 3 种

类型,通过 UALCAN 数据库分析发现 AKAP12 在乳腺癌各亚型中的蛋白表达情况:正常乳腺组织 > Luminal 型乳腺癌 > HER2 阳性乳腺癌 > TNBC ( $P < 0.05$ , 图 2C)。以上结果提示,AKAP12 高表达在乳腺癌中可能是一种保护性因素,而 AKAP12 的表达下调可能与乳腺癌患者的预后不良相关。

2.4 RBM7 对 AKAP12 RNA 和蛋白表达的影响

qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,人源性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中过表达 RBM7 后,AKAP12 的 RNA 和蛋白表达水平明显降低,差异有统计学意义



A: The main pathway regulated by RBM7 was identified through RNA-sequence. B: The expression of AKAP12 in various cancers from UALCAN database was investigated. breast cancer: normal ( $n=18$ ), primary tumor ( $n=125$ ); colon cancer: normal ( $n=100$ ), primary tumor ( $n=97$ ); ovarian cancer: normal ( $n=25$ ), primary tumor ( $n=100$ ); clear cell renal cell carcinoma (RCC): normal ( $n=84$ ), primary tumor ( $n=110$ ); uterine confined endometrial cancer (UCEC): normal ( $n=31$ ), primary tumor ( $n=100$ ); lung cancer: normal ( $n=111$ ), primary tumor ( $n=111$ ). C: The expression of AKAP12 in breast cancer from UALCAN database was investigated. Compared with the Normal group,  $^*P < 0.05$ .

图2 RBM7 的主要富集通路及 AKAP12 在人癌组织中的蛋白表达情况

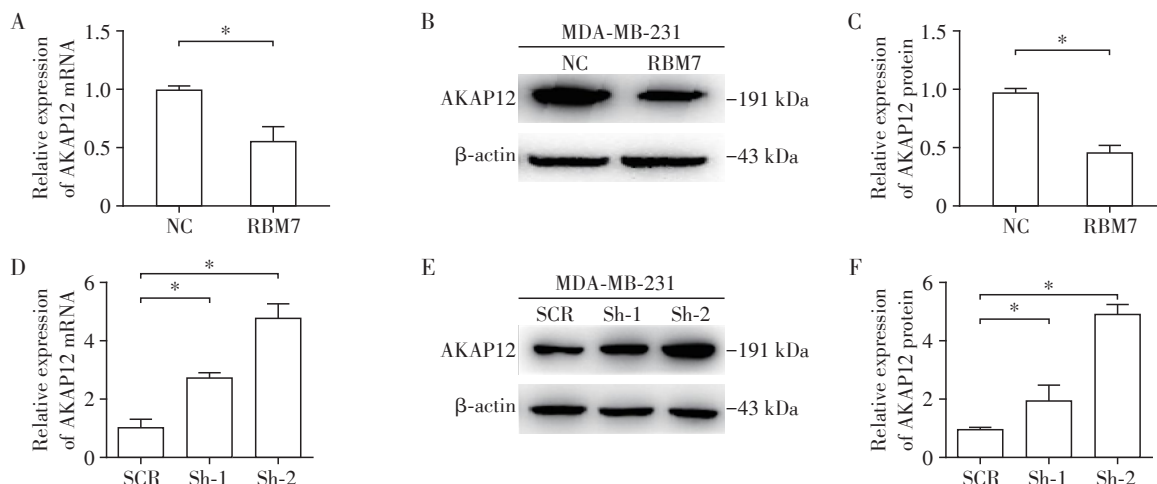
Figure 2 The main pathway regulated by RBM7 and the protein expression of AKAP12 in cancers

( $P < 0.05$ , 图 3A~C); 干扰 RBM7 后, AKAP12 的 RNA 和蛋白表达水平明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 3D~F)。提示在人源性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 RBM7 可显著负调节 AKAP12 的

表达。

### 2.5 RBM7 直接结合 AKAP12 的 mRNA

基于上述所描述的 RBM7 与 AKAP12 表达的相关性, 本研究通过 RIP 实验明确 RBM7 与 AKAP12 表



A: The overexpression of RBM7 regulated RNA expression of AKAP12 in breast cancer cell MDA-MB-231 via qRT-PCR. B, C: The overexpression of RBM7 regulated protein expression of AKAP12 in breast cancer cell MDA-MB-231 via Western blot. D: The knockdown of RBM7 regulated RNA expression of AKAP12 in breast cancer cell MDA-MB-231 via qRT-PCR. E, F: The knockdown of RBM7 regulated protein expression of AKAP12 in breast cancer cell MDA-MB-231 via Western blot. \* $P < 0.05$ ( $n=3$ ).

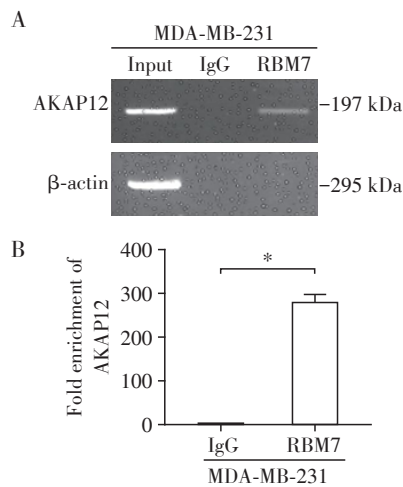
图3 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 RBM7 负调节 AKAP12 的表达

Figure 3 RBM7 negatively regulated the expression of AKAP12 in breast cancer cell MDA-MB-231

达的相关性。将 RIP 实验获得的 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳实验, 结果显示加 RBM7 抗体复合物的实验组中有 AKAP12 的表达, 而加 IgG 抗体复合物的对照组中无 AKAP12 的表达。作为阴性对照, RBM7 不能与  $\beta$ -actin 结合(图 4A)。同时将 RIP 实验获得的 RNA 进一步行 qRT-PCR 实验, 结果显示在实验组、空白对照组和阴性对照组之中, 实验组(RBM7) AKAP12 的 RNA 表达水平较阴性对照组(IgG)明显增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 4B)。这些研究结果表明在人源性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 RBM7 能直接结合 AKAP12 的 mRNA, 从而调节 AKAP12 的表达。

### 2.6 RBM7 调节乳腺癌组织中 AKAP12 的表达

IHC 分析发现人乳腺癌组织中, RBM7 高表达组中的 AKAP12 表达相比 RBM7 低表达组中的表达更低(图 5)。进一步分析乳腺癌组织中 RBM7 与 AKAP12 的表达情况, 以及临床病理资料的关系, 发现 AKAP12 低表达的乳腺癌组织中 RBM7 高表达的例数较多; AKAP12 高表达的乳腺癌组织中 RBM7 低表达的例数较多, 且差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表 1)。其中, 有 2 例(8.3%)临床病理数据缺失, 已在分析中予以排除。所有这些都表明, 在乳腺癌组织中, RBM7 显著负调节 AKAP12 的表达。



A: MDA-MB-231 cell lysates were collected and immunoprecipitated with RBM7 antibody or control IgG followed by RT-PCR to detect AKAP12 mRNA levels. B: MDA-MB-231 cell lysates were collected and immunoprecipitated with RBM7 antibody or control IgG followed by qRT-PCR to detect AKAP12 mRNA levels. \* $P < 0.05$ ( $n=3$ ).

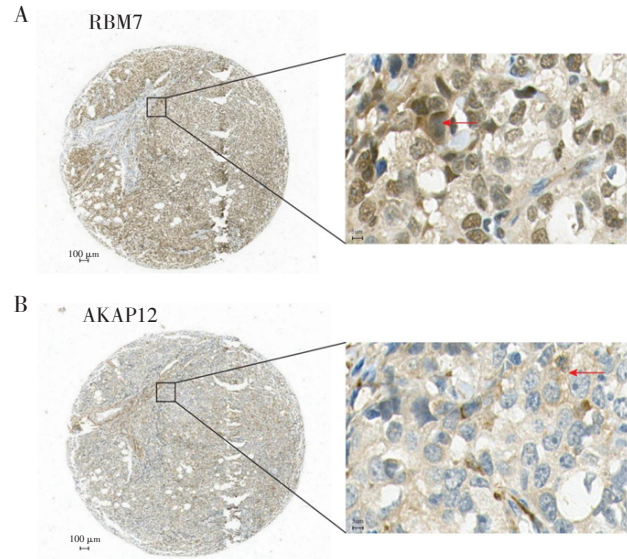
图4 RBM7 结合 AKAP12 mRNA 调节 AKAP12 表达

Figure 4 RBM7 binded to AKAP12 mRNA to regulate AKAP12 expression

## 3 讨论

RBP 在真核转录组的转录后调控过程中起至

关重要的作用；具体来说，RBP直接结合RNA的UTR，并涉及RNA加工各个环节，例如RNA定位、剪接、转运、稳定性和翻译等，从而参与到整个细胞过程中<sup>[13]</sup>。据报道，RBP可以影响多种癌症的复杂环节，包括癌细胞增殖、凋亡和激活转移等<sup>[14]</sup>。在乳腺癌中，RBM38通过调节PTEN和c-Myc的mRNA稳定性从而发挥肿瘤的抑癌作用<sup>[15]</sup>；上调RBMS2增强乳腺癌细胞对阿霉素的敏感性并促使其发生凋亡<sup>[16]</sup>；此外，RBMS3作为一种乳腺癌肿瘤抑制因子，通过调节Twist1稳定性从而抑制乳腺癌细胞的增殖和转移<sup>[17]</sup>。RBM7作为一种RNA外切体辅助因子靶向复合物NEXT(hMTR4/SKIV2L2-ZCCHC8-RBM7)结构中的核心RBP组分，其主要通过RRM与靶mRNA中富含尿苷的序列特异性结合从而发挥作用<sup>[18]</sup>。本课题组前期发现，RBM7在乳腺癌细胞和组织中表达上调，与不良预后呈正相关；且经RNA测序发现RBM7可能调节与细胞周期有关的基因，其中CDK1和P21是RBM7调节的主要基因之一；RBM7不仅与CDK1 mRNA结合，还可直接结合CDK1 mRNA的3'-UTR中的ARE<sup>[7]</sup>。为进一步探究RBM7在细胞周期中发挥的重要作用以及其主要作用的靶基因，本研究进一步发现，在人乳腺癌细胞系MDA-MB-231和乳腺癌组织中，RBM7可负调节细胞周期有丝分裂负调节剂AKAP12的表达，这为进一步探讨RBM7作为乳腺癌患者潜在的预后评估靶点提供全新的视角。



A: RBM7 expression was higher in 24 human breast cancer tissues (×4). The arrow showed the location of RBM7 in breast cancer cell was in nuclear(×80). B: AKAP12 expression was higher in human breast cancer tissues (×4). The arrow showed the location of AKAP12 in breast cancer cell was in the cytoplasm(×80).

图5 RBM7和AKAP12在乳腺癌组织中的表达情况  
Figure 5 The expression of RBM7 and AKAP12 in human breast cancer tissues

AKAP12是激酶支架蛋白家族的成员之一<sup>[19]</sup>，其分子量为200~300 kDa，通常定位于细胞质和细胞边缘，功能是将蛋白激酶A、蛋白激酶C和细胞周期蛋白锚定到细胞质膜上，在有丝分裂过程中发挥负调节作用<sup>[20]</sup>。尽管AKAP12在多种人类癌症中均

表1 乳腺癌组织中RBM7和AKAP12蛋白的表达与患者临床病理特征的关系

Table 1 The relationship between the expression of RBM7 and AKAP12 proteins in breast cancer tissues and the clinicopathological characteristics of patients

Clinic pathological characteristic	Case(n)	RBM7 high expression(n=15)[n(%)]	RBM7 low expression(n=9)[n(%)]	P
AKAP12				0.003
High expression	9	2(22.22)	7(77.78)	
Low expression	15	13(86.67)	2(13.33)	
Age				>0.05
≥50 years	11	6(54.55)	5(45.45)	
<50 years	11	8(72.73)	3(27.27)	
Tumor size				>0.05
> 2 cm	9	6(66.67)	3(33.33)	
≤ 2 cm	13	8(61.54)	5(38.46)	
Lymph node metastasis				>0.05
Present	9	4(44.44)	5(55.56)	
Absent	13	10(76.92)	3(23.08)	
Pathological grade				>0.05
III-IV	14	9(64.29)	5(35.71)	
I-II	8	5(62.50)	3(37.50)	

表达下调,但AKAP12调节细胞周期、抑制肿瘤生长的具体机制尚未阐明<sup>[21]</sup>。既往研究表明,肿瘤细胞的生长发育是由细胞有丝分裂驱动,同时有丝分裂又依赖于细胞周期中各环节之间的相互协调,这涉及一系列需要严格调控的分子,包括细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)、视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb)和 polo 样激酶(polo-like kinase, Plk),以及细胞信号转导等多个步骤<sup>[20]</sup>。其中,参与信号转导的蛋白主要由支架蛋白如 AKAP 维持, AKAP 家族成员(AKAP8、AKAP12、Ezrin 等)通过其保守的短 $\alpha$ 螺旋结构将蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和细胞周期蛋白等信号效应成分的定向转运至特定的细胞微结构中<sup>[22]</sup>。研究发现在小鼠胚胎成纤维细胞系 NIH 3T3 中,受四环素诱导的 AKAP12 表达通过抑制细胞外信号调节激酶 2(extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2)依赖细胞周期蛋白 D1 的表达和 Rb 磷酸化,从而发生细胞周期 G1 期停滞<sup>[23-25]</sup>。然而,当前对于 AKAP12 在乳腺癌中的具体功能仍未详细阐述:其一,其调控免疫反应、抑制肿瘤的具体分子通路尚未完全阐明;其二,作为功能调控的重要环节, RNA 结合蛋白与 AKAP12 的潜在相互作用,以及此类互作是否参与 AKAP12 的功能激活、定位调控或下游信号传递,尚未有明确研究证据支持,这也成为进一步揭示 AKAP12 在乳腺癌中作用机制的重要方向之一。基于此,本研究经 RNA-seq 分析发现,受 RBM7 影响的显著表达的基因主要富集在细胞周期通路。因而,猜想受 RBM7 影响的显著表达的基因可能在细胞周期过程中扮演重要角色,如 CDK1、P21 和 AKAP12 等;且经 UALCAN 数据库检测发现细胞周期负调节剂 AKAP12 在乳腺癌中低表达,推测 AKAP12 高表达在乳腺癌中是一种保护性因素,在乳腺癌中抑制细胞周期的进展。

本研究初步探讨 RBM7 与 AKAP12 的表达在人源性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中呈负相关, RBM7 过表达可以抑制 AKAP12 的 mRNA 和蛋白表达。通过 RIP 实验验证在人源性乳腺癌细胞 BT474 中, RBM7 直接结合 AKAP12 的 mRNA 从而发挥其负性调节作用。进一步分析乳腺癌组织中 RBM7 与 AKAP12 的表达,以及临床病理资料的关系,发现在乳腺癌组织中, RBM7 与 AKAP12 的表达也呈负相关, AKAP12 低表达的乳腺癌组织中 RBM7 高表达的

例数较多。这与先前的文献及数据库资料一致<sup>[9-11]</sup>, RBM7 在乳腺癌组织和细胞中的表达水平显著增高,在人源性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和乳腺癌组织中负调节 AKAP12 的表达,有望作为预测乳腺癌不良预后的指标。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明均无潜在利益冲突。

#### Conflict of Interests:

All authors declare that no potential conflict of interests.

#### 作者贡献声明:

石靛负责数据分析和文章撰写,奚佩雯负责设计课题,吴靛负责免疫组化分析,张旭负责研究结果制图,丁强负责文章修改和监督。

#### Author's Contributions:

SHI Liang conducted data analysis and drafted the manuscript. XI Peiwen conceived and designed the project. WU Jing analyzed immunohistochemistry. ZHANG Xu created graphs based on research results. DING Qiang revised the manuscript and supervision.

#### [参考文献]

- [1] HE S Y, VALKOV E, CHELOUFI S, et al. The nexus between RNA-binding proteins and their effectors [J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(5): 276-294
- [2] 赵海贝, 谷慧英, 周重阳, 等. RNA 结合蛋白参与肿瘤发生发展的机制研究进展[J/OL]. *生理科学进展*, 2025 [2025-07-10]. <https://link.cnki.net/doi/10.20059/j.cnki.pps.2025.07.1029>
- [3] ZHAO H B, GU H Y, ZHOU C Y, et al. Research progress on the mechanisms of RNA-binding proteins in tumorigenesis and development [J/OL]. *Progress in Physiological Sciences*, 2025 [2025-07-10]. <https://link.cnki.net/doi/10.20059/j.cnki.pps.2025.07.1029>
- [4] BONCZEK O, WANG L X, GNANASUNDRAM S V, et al. DNA and RNA binding proteins: from motifs to roles in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9329
- [5] 雍红梅, 周学义, 赵 薇, 等. RBM4a 基因表达与功能研究进展 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(7): 1009-1013
- [6] YONG H M, ZHOU X Y, ZHAO W, et al. Research progress of RBM4 agene expression and function [J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2018, 38(7): 1009-1013
- [7] JIANG X, XU J, LIAO Z, et al. RNA binding sensitivity of nonstructural protein 8 revealed by small-angle neutron scattering and alpha fold 2 prediction [J]. *ACS Nano*, 2025, 19(42): 36876-36883
- [8] PUNO M R, LIMA C D. Structural basis for RNA surveil-

- lance by the human nuclear exosome targeting (NEXT) complex[J]. *Cell*, 2022, 185(12):2132–2147
- [7] XI P W, ZHANG X, ZHU L, et al. Oncogenic action of the exosome cofactor RBM7 by stabilization of CDK1 mRNA in breast cancer[J]. *NPJ Breast Cancer*, 2020, 6: 58
- [8] 奚佩雯, 胡 玥, 张 旭, 等. RBM7 在乳腺癌细胞 BT474 中的表达及其与 P21 的关系[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(2): 160–165, 173
- XI P W, HU Y, ZHANG X, et al. The expression of RBM7 and its relationship with P21 in breast cancer cell BT474 [J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2020, 40(2): 160–165, 173
- [9] CARTER H. Loss of RNA-binding protein RBMS1 promotes a metastatic transcriptional program in colorectal cancer[J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(9): 1261–1262
- [10] THIMME GOWDA C, SIRAGANAHALLI ESHWARAIAH M, WANG J H, et al. The AKAP12-PKA axis regulates lipid homeostasis during alcohol-associated liver disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 109
- [11] 王迎洪, 袁 敏, 铁海龙, 等. AKAP12 调控 AMPK/mTOR 信号通路介导卵巢癌细胞增殖、凋亡和侵袭的作用及机制[J]. *天津师范大学学报(自然科学版)*, 2024, 44(6): 13–19
- WANG Y H, YUAN M, TIE H L, et al. Role and mechanism of AKAP12 regulation on AMPK/mTOR signaling pathway mediating cell proliferation, apoptosis and invasion in ovarian cancer cells[J]. *Journal of Tianjin Normal University (Natural Science Edition)*, 2024, 44(6): 13–19
- [12] LIU Z K, HU S Y, ZHAO X L, et al. AKAP12 positive fibroblast determines immunosuppressive contexture and immunotherapy response in patients with TNBC by promoting macrophage M2 polarization [J]. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(10): e009877
- [13] SUN S Y, LI X C, ZHAI J N, et al. Orchestrating nutrient homeostasis: rna-binding proteins as molecular conductors in metabolic disease pathogenesis [J]. *Nutrients*, 2025, 17(14): 2367
- [14] METHAWASIN M, MEINKE S, RADKE M H, et al. Rbm20 antisense oligonucleotides alleviate diastolic dysfunction in a mouse model of cardiometabolic heart failure (HFpEF)[J]. *Cardiovasc Res*, 2025, 121(13): 2027–2041
- [15] WU J, ZHOU X J, SUN X, et al. RBM38 is involved in TGF- $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition by stabilizing zonula occludens-1 mRNA in breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(5): 675–684
- [16] XU F, XIA T, XU Q T, et al. RBMS2 chemosensitizes breast cancer cells to doxorubicin by regulating BMF expression[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(4): 1724–1736
- [17] ZHU L, XI P W, LI X X, et al. The RNA binding protein RBMS3 inhibits the metastasis of breast cancer by regulating Twist1 expression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 105
- [18] GERLACH P, GARLAND W, LINGARAJU M, et al. Structure and regulation of the nuclear exosome targeting complex guides RNA substrates to the exosome [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(13): 2505–2518
- [19] LI X Y, DONG H, ZHENG Y F, et al. AKAP12 inhibits esophageal squamous carcinoma cell proliferation, migration, and cell cycle *via* the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Mol Cell Probes*, 2023, 72: 101939
- [20] ZHOU M R, LI H F, GAO B, et al. The prognostic impact of pathogenic stromal cell-associated genes in lung adenocarcinoma[J]. *Comput Biol Med*, 2024, 178: 108692
- [21] HAN B, POPPINGA W J, SCHMIDT M. Scaffolding during the cell cycle by A-kinase anchoring proteins [J]. *Pflugers Arch*, 2015, 467(12): 2401–2411
- [22] POPPINGA W J, MUÑOZ-LLANCAO P, GONZÁLEZ-BILLAULT C, et al. A-kinase anchoring proteins: cAMP compartmentalization in neurodegenerative and obstructive pulmonary diseases [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(24): 5603–5623
- [23] LIN X, NELSON P, GELMAN I H. SSeCKS, a major protein kinase C substrate with tumor suppressor activity, regulates G(1)->S progression by controlling the expression and cellular compartmentalization of cyclin D [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(19): 7259–7272
- [24] KOMORI T, HISAOKA T, KURIYAMA E, et al. Breakdown of blood-brain barrier, astrocytic endfeet swelling, and abnormal behaviors by blockade of TROY signaling in TROY-Fc transgenic mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2025, 130: 106083
- [25] ZHANG T, JIN K Y, ZENG S X, et al. Divergent redox responses of macular and peripheral Müller glia: implications for retinal vulnerability [J]. *Redox Biol*, 2025, 85: 103691

[收稿日期] 2025-08-27

(本文编辑: 戴王娟)