



中国临床医学

Chinese Journal of Clinical Medicine

ISSN 1008-6358

CN 31-1794/R

结直肠癌组织Rab27A的表达及意义

俞士勇, 彭欢, 王化恺, 骆洋, 项洪刚

引用本文:

俞士勇, 彭欢, 王化恺, 等. 结直肠癌组织Rab27A的表达及意义[J]. 中国临床医学, 2021, 28(5): 885-889.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20201668>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

生长因子受体结合蛋白2表达与结直肠癌进展和预后的相关性

The relationship between growth factor receptor-bound protein 2 expression and the progression and prognosis of colorectal cancer

中国临床医学. 2016, 23(5): 570-575 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160103>

磁共振DKI成像预测直肠癌TN分期、分化和脉管侵犯的应用价值

Application value of magnetic resonance diffusion kurtosis imaging in predicting TN stage, differentiation and vascular invasion of rectal cancer

中国临床医学. 2020, 27(6): 1020-1025 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20201841>

上海市原卢湾区2004-2011年消化系统常见肿瘤的发病和死亡趋势分析

Analysis of incidence and mortality trends of common gastrointestinal cancers in Luwan District of Shanghai from 2004 to 2011

中国临床医学. 2018, 25(4): 542-548 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20171118>

同时性结直肠癌原发灶和肝转移灶中KRAS基因突变的一致性分析

Consistency analysis of KRAS mutation between primary tumors and paired liver metastases in synchronous colorectal live metastasis

中国临床医学. 2019, 26(4): 549-554 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190830>

结直肠癌分子分型及分子标志物的研究进展

Research progress on molecular typing and molecular markers of colorectal cancer

中国临床医学. 2019, 26(1): 111-116 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20180455>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20201668

结直肠癌组织 Rab27A 的表达及意义

俞士勇¹, 彭 欢¹, 王化恺¹, 骆 洋², 项洪刚^{1*}

1. 上海市浦东新区人民医院普通外科, 上海 201299

2. 上海交通大学医学院附属仁济医院胃肠外科, 上海 200127

引用本文 俞士勇, 彭 欢, 王化恺, 等. 结直肠癌组织 Rab27A 的表达及意义[J]. 中国临床医学, 2021, 28(5): 885-889. YU S Y, PENG H, WANG H K, et al. Significance of expression of Rab27A in colorectal cancer[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2021, 28(5): 885-889.

【摘要】 目的:在基因和蛋白水平检测结直肠癌组织及相应的癌旁组织中 Rab27A 表达情况,并探讨其与结直肠癌患者临床特点的相关性及临床意义。**方法:**回顾性分析 2005 年 1 月至 2019 年 1 月在上海市浦东新区人民医院普通外科和上海交通大学医学院附属仁济医院胃肠外科接受手术治疗的 125 例结直肠癌患者的结直肠癌病理标本及其临床病理资料。采用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和 Western 印迹法分别检测其中 32 对和 8 对结直肠癌患者的肿瘤组织和相应的癌旁组织(距癌组织边缘>5 cm)中 Rab27A mRNA 和蛋白表达情况。免疫组织化学检测 125 例结直肠癌组织中 Rab27A 表达情况,计算 Rab27A 染色强度,并分析其与临床特点之间的关系。**结果:**在 32 对结直肠癌肿瘤组织和癌旁组织中,肿瘤组织中 Rab27A mRNA 表达水平明显高于癌旁正常临床组织($P=0.001$)。在 8 对结直肠癌肿瘤组织和癌旁组织中,肿瘤组织中蛋白表达水平明显高于癌旁正常组织。肿瘤大小和临床分期在 Rab27A 蛋白高表达组和低表达组差异有统计学意义($P=0.037, 0.017$)。生存分析结果显示, Rab27A 表达水平越高,结直肠癌患者预后越差。同时,多因素分析表明, Rab27A 在结直肠癌患者中可作为独立的预后分子标志物。**结论:**Rab27A 在结直肠癌的发生发展中起重要作用,可作为反映结直肠癌生物学行为的潜在有效指标。

【关键词】 结直肠癌; Rab27A; 预后

【中图分类号】 R 753.3⁺5 **【文献标志码】** A

The expression and significance of Rab27A in colorectal cancer

YU Shi-yong¹, PENG Huan¹, WANG Hua-kai¹, LUO Yang², XIANG Hong-gang^{1*}

1. Department of General Surgery, Shanghai Pudong New Area People's Hospital, Shanghai 201299, China

2. Department of Gastrointestinal Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

【Abstract】 Objective: To investigate the expression of Rab27A in colorectal cancer (CRC) at the gene and protein level, and analyze its correlation with clinical characteristics. **Methods:** From January 2005 to January 2019, 125 patients with CRC who received operation at the Department of General Surgery of Shanghai Pudong New Area People's Hospital and the Department of Gastrointestinal Surgery of Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine were included, the CRC pathological specimens and clinical data of the patients were retrospectively analyzed. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting analyses were used to detect the expression of Rab27A mRNA and protein in tumor tissues and corresponding adjacent tissues (more than 5 cm from the edge of cancer tissues) of 32 and 8 pairs of CRC patients, respectively. The expression of Rab27A in 125 cases of CRC was examined by immunohistochemistry (IHC). The correlation between Rab27A expression and clinical characteristics in 125 cases of CRC were then analyzed. **Results:** The expression level of Rab27A mRNA in tumor tissues was significantly higher than that in adjacent normal tissues ($P=0.001$). In 8 pairs of colorectal cancer tissues and adjacent tissues, the protein expression level in tumor tissues was significantly higher than that in adjacent normal tissues ($P=0.037, 0.017$). It showed that high expression of Rab27A was significantly correlated with tumor size and clinical stage. Survival analysis results suggested that CRC patients with overexpression of Rab27A protein

【收稿日期】 2020-07-27

【接受日期】 2020-11-22

【基金项目】 上海市浦东新区卫生系统学科带头人培养计划(PWRd2018-01). Supported by Academic Leaders Training Program of Pudong Health Bureau of Shanghai (PWRd2018-01).

【作者简介】 俞士勇, 硕士, 副主任医师. E-mail: 32665863@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-20509000-2347, E-mail: xianghonggang@aliyun.com

had shorter overall survival. Multivariate Cox regression analysis showed that Rab27A expression might be an independent prognostic factor for CRC. **Conclusions:** Rab27A plays an important role in the occurrence and development of CRC, and can be used as a potentially effective indicator reflecting the biological behavior of CRC.

[Key Words] colorectal cancer; Rab27A; prognosis

结直肠癌发病率及致死率在全球居高不下^[1]。早期结直肠癌患者多无特殊症状,或仅有腹痛、排便习惯改变等非特异性表现。多数患者确诊时已为进展期或晚期,而进展期结直肠癌患者术后由于易复发和转移,预后相对较差^[2]。因此,探索结直肠癌患者的早期诊断和预后判断十分重要。临床上主要通过影像学检查、消化内镜及病理检查诊断结直肠肿瘤,而分子标志物应用相对较少。借助分子基因技术,在微观层面上研究结直肠癌的发生发展越来越被重视。

Rab 蛋白是小 GTP 蛋白酶,其相对分子量为 20 000~30 000,存在于大多真核细胞内与膜相关细胞器中^[3]。Rab27 是 Rab 蛋白主要的成员之一,包含 2 种亚型,分别为 Rab27A 和 Rab27B^[4]。研究^[5]表明,Rab27A 在机体中主要作用是帮助运输小泡聚集和靠近靶膜,进而导致外泌体释放。细胞内的 Rab27A 异常表达可促进癌症的发生及增加远处转移机会。例如 Rab27A 可促进乳腺癌的发生^[6],其过度表达与胃癌和卵巢癌的发生和转移也密切相关^[7]。目前认为,Rab27A 的表达异常在癌症发生发展过程中起重要作用。然而,国内有关 Rab27A 在结直肠癌中作用的报道尚不多见。

本研究通过比较 Rab27A mRNA 和蛋白在结直肠癌组织和正常组织间表达水平的差异,同时分析 Rab27A 表达与结直肠癌患者临床病理资料的相关性及 Rab27A 与结直肠癌患者预后的关系,探讨其在结直肠癌诊治中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2005 年 1 月至 2019 年 1 月在上海市浦东新区人民医院普通外科和上海交通大学医学院附属仁济医院胃肠外科接受手术治疗的 125 例结直肠癌患者的结直肠癌组织标本及临床病理资料。患者在手术前未接受新辅助化疗或其他针对肿瘤的治疗,均经病理组织学检查确诊。本研究经浦东新区人民医院伦理委员会和仁济医院伦理委员会审核批准(prylz 2020-008),所有患者均知情同意。

1.2 实验试剂 TRIzol 试剂盒、逆转录试剂盒及 qPCR 试剂盒购自大连宝生物工程公司。Rab27A

抗体购自英国 Abcam 公司,GAPDH 和山羊多克隆抗兔 IgG 购自美国 Proteintech 公司。

1.3 实时定量 PCR(qRT-PCR) 使用 TRIzol 试剂盒从组织中提取 RNA,根据 GeneAmp PCR System 9600 的说明书,逆转录总 RNA 成 cDNA。逆转录条件:37℃,15 min;85℃,5 s。Rab27A 引物:正义链 5'-GAA GCC ATA GCA CTC GCA GAG-3',反义链 5'-ATG ACC ATT TGA TCG CAC CA-3';内参 GAPDH 引物:正义链 5'-ACT CGT CAT ACT CCT GCT-3',反义链 5'-GAA ACT ACC TTC AAC TCC-3'。数据分析采用 2^{-ΔΔCT} 法。以上实验进行 3 次,取均值。

1.4 Western 印迹法 结直肠癌组织和癌旁组织样品中加入适量的裂解液,低温离心 10 min 后获取目标蛋白。将目标蛋白与蛋白上样缓冲液混合,100℃金属浴 5 min,冷却后即可上样。上样结束后电泳 90 min,转膜,封闭,孵育一抗(Rab27A, Abcam 公司,1:1 000)。4℃过夜,第 2 天孵育二抗 60 min。PVDF 膜上均匀滴加适量发光液,ECL 底物发光。

1.5 免疫组化 组织切片经二甲苯脱蜡,水化,梯度乙醇脱水后,用 0.3%过氧化氢孵育 15 min,微波修复 15 min,自然冷却后 10%牛血清白蛋白封闭 30 min,滴加 PBS 稀释过的 Rab27A 抗体(1:200),4℃过夜,HRP 标记的二抗孵育 30 min,在显微镜下进行 DAB 显色。最后苏木精复染,中性树胶封片。Rab27A 染色阳性表现为棕黄色或棕褐色颗粒,主要位于细胞质中。光镜下随机观察 10 个高倍镜视野,记录 1 000 个肿瘤细胞中阳性细胞百分比,结合着色强度,按照表 1 的方式进行半定量评分:每个肿瘤细胞最后得分为两项乘积,小于 4 分为 Rab27A 低表达,大于或等于 4 分为 Rab27A 高表达。

表 1 免疫组化染色计分标准

阳性细胞百分数(%)	计分	着色强度	计分
0	0	无	0
1~25	1	弱(淡黄色)	1
25~50	2	中(棕黄色)	2
>50	3	强(棕褐色)	3

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行数据处理。采用 t 检验比较结直肠癌组织 mRNA 水平;采

用 χ^2 检验比较 Rab27A 表达水平与临床病理数据相关性;采用 Kaplan-Meier 生存曲线和 log-rank 检验比较 Rab27A 与结直肠癌生存率的关系。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 结直肠癌组织及癌旁组织中 Rab27A mRNA 和蛋白表达水平差异 选取 32 对结直肠癌肿瘤组

织和相应的癌旁组织进行 qRT-PCR 实验,结果(图 1A)显示,结直肠癌肿瘤组织中 Rab27A mRNA 表达水平明显高于癌旁正常组织($P=0.001$)。随机选取其中 8 对结直肠癌肿瘤组织和癌旁组织进行 Western 印迹实验,结果(图 1B)表明,结直肠癌肿瘤组织中 Rab27A 蛋白表达水平明显高于癌旁组织。上述结果表明,Rab27A mRNA 水平和蛋白水平在结直肠癌细胞中均为高表达。

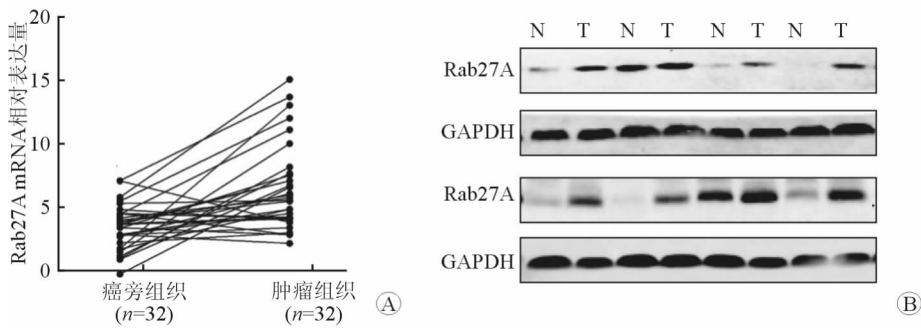


图 1 Rab27A mRNA 和蛋白在结直肠癌肿瘤组和癌旁组织组织中的表达情况

A: Rab27A mRNA 和蛋白在 32 对结直肠癌肿瘤组织和对应的癌旁组织中的表达水平($P=0.001$);B: Rab27A 蛋白在 8 对结直肠癌肿瘤组织(T)和对应的癌旁组织(N)中的表达水平。

2.2 结直肠癌组织中 Rab27A 表达水平与临床特点的关系 结果(图 2)显示:Rab27A 蛋白主要表达于细胞质中,在细胞核中也少许表达;Rab27A 在肿瘤组织中表达水平明显高于癌旁组织。根据表 1 对 Rab27A 的表达进行评分,根据评分结果分为 Rab27A 高表达组($n=76$)和 Rab27A 低表达组($n=49$)。结果(表 2)显示,肿瘤大小和临床分期在两组中差异均有统计学意义($P=0.037, P=0.017$),而患者的年龄、性别、肿瘤发生部位及 CEA 水平在两组中差异无统计学意义。

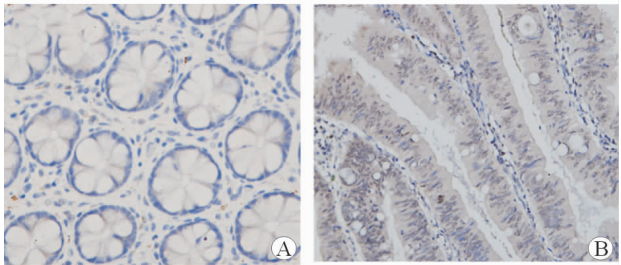


图 2 采用免疫组化检测 Rab27A 在结直肠癌组织和癌旁组织中的表达水平

A:癌旁组织;B:肿瘤组织。 Original magnification: ×200。

表 2 Rab27A 高表达组与低表达组患者的临床病理特点比较

				$n(\%)$
指标	低表达组($n=49$)	高表达组($n=76$)	χ^2 值	P 值
年龄/岁			0.229	0.632
≤65	16(32.7)	28(36.8)		
>65	33(67.3)	48(63.2)		
性别			0.386	0.534
男性	26(53.1)	36(47.4)		
女性	23(46.9)	40(52.6)		
肿瘤大小/cm			4.356	0.037
≤5	30(61.2)	32(42.1)		
>5	19(38.8)	44(57.9)		
肿瘤位置			0.274	0.601
直肠	28(57.1)	47(61.8)		
结肠	21(42.9)	29(38.2)		

续表

指标	低表达组 (n = 49)	高表达组 (n = 76)	χ^2 值	P 值
血清 CEA 水平/(ng · mL ⁻¹)			2. 019	0. 155
≤5	27(55. 1)	32(42. 1)		
>5	22(44. 9)	44(57. 9)		
临床分期			5. 650	0. 017
I ~ II	28(57. 1)	27(35. 5)		
III ~ IV	21(42. 9)	49(64. 5)		

2.3 Rab27A 与结直肠癌患者预后的关系 结果(图 3)表明:Rab27A 表达水平与结直肠癌患者预后可能存在相关性,即 Rab27A 表达水平越高,患者生存期越短。单因素分析结果(表 3)表明,Rab27A 表达水平、肿瘤大小及临床分期与结直肠癌患者预后具有相关性。多因素分析结果(表 3)表明,Rab27A 或可作为结直肠癌患者预后独立预测分子标志物。

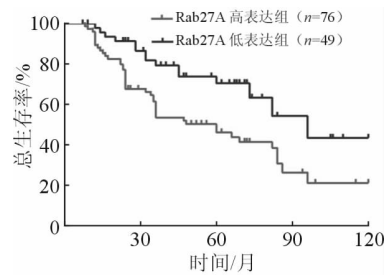


图 3 Rab27A 表达水平与结直肠癌患者生存率关系

表 3 结直肠癌患者预后单因素和多因素分析

n = 125

变量	单因素分析			多因素分析		
	RR	95%CI	P 值	RR	95%CI	P 值
Rab27A 表达水平(高 vs 低)	2. 055	1. 218~3. 466	0. 007	1. 816	1. 074~3. 076	0. 026
年龄(>65 vs ≤65)	1. 129	0. 672~1. 897	0. 647	-	-	-
性别(男 vs 女)	1. 138	0. 669~1. 938	0. 633	-	-	-
肿瘤大小(>5 vs ≤5)	1. 593	0. 947~2. 680	0. 044	1. 806	1. 067~3. 071	0. 028
肿瘤位置(结肠 vs 直肠)	0. 852	0. 488~1. 488	0. 573	-	-	-
CEA 水平(>5 vs ≤5)	1. 505	0. 902~2. 510	0. 118	-	-	-
临床分期(I ~ II vs III ~ IV)	1. 981	1. 430~2. 745	0. 001	2. 042	1. 454~2. 868	0. 001

3 讨 论

以 Rab 家族为代表的经典小 GTP 蛋白在机体正常的信号转导过程中扮演重要角色。Rab 家族通过在 GDP 结合的非激活状态与 GTP 结合的激活状态之间的转化,参与调控正常的生物学功能^[8]。有研究^[9-10]显示,Rab 家族在肿瘤发生发展过程中同样起着至关重要的作用,例如 Rab25 可通过激活 Akt/GSK-3 β 信号通路介导上皮细胞和间叶细胞的转化,增强胃癌细胞的侵袭能力^[9];Rab25 在卵巢癌患者肿瘤组织中表达量越高,患者术后预后越差;Rab25 也可作为卵巢癌术后患者的预后预测分子^[10]。Rab5 与胞膜上的整合素相互作用促进膜内骨架蛋白形成细胞伪足,同时肿瘤细胞提高金属基质蛋白酶(MMP)9、MMP2 等分子的分泌,加快细

胞外基质的溶解,加快肿瘤细胞的扩散^[11]。乳腺癌细胞中 Rab8 和 Rab7 有助于膜型金属蛋白酶 1 (MT1-MMP)的分泌,而 Rab7 的显性失活损害乳腺癌细胞迁移和侵袭能力^[12]。

研究^[13]表明,Rab27A 在囊泡运输过程中,特别是细胞外泌体的形成和分泌中发挥重要作用。外泌体在肿瘤细胞的增殖和迁移中作用显著^[14],且是理想的肿瘤抗原标志。因此干扰 Rab27A 的表达可影响外泌体的分泌和生物功能,进而影响肿瘤的发生发展。Wang 等^[15]指出,Rab27A 在胰腺癌细胞中表达水平异常升高,且表达量越高,患者预后越差,提示其可作为胰腺癌预后的预测分子。另有研究^[16]指出,Rab27A 通过促进胰岛素样生长因子 2 (IGF-2)的分泌,可增强乳腺癌细胞侵袭和远处转移能力,使乳腺癌患者预后更差。Chang 等^[17]指

出,miRNA-134-3 能通过降低 Rab27A 的表达来抑制卵巢癌细胞的增殖和周期,从而抑制肿瘤细胞的发生。Rab27A 还与血管生成相关,抑制其表达会降低血管内皮生长因子受体 1(VEGF-1)的棕榈酰化,从而减弱 VEGF-1 稳定性,使血管新生增加^[18]。

本研究发现结直肠癌组织中 Rab27A mRNA 和蛋白较癌旁正常组织表达明显增高。免疫组织化学法结果也提示结直肠癌组织中存在 Rab27A 高表达现象。Rab27A 蛋白与结直肠癌临床分期及肿瘤大小正相关,提示 Rab27A 可能参与肿瘤的分化及生长过程。单因素分析表明,Rab27A 表达水平升高与结直肠癌总体生存期相关;多因素分析表明,Rab27A 的表达水平升高是结直肠癌的危险因素,提示在结直肠癌诊断治疗中,Rab27A 可作为一种新的潜在预后标志物。

本研究存在一定局限性:病例数所限,且常规将肿瘤临床分期分 2 组进行初步比较,而Ⅳ期肿瘤与Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期肿瘤的在生物学行为、诊断、治疗及预后等多有不同,未来将对此进行改进。

综上所述,研究表明,Rab27A 与结直肠直肠癌发生发展有较强相关性,可作为潜在预后预测分子进行深入研究,或可成为结直肠癌诊治的一个新靶点。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] KISHIKI T, MASAKI T, MATSUOKA H, et al. Modified Glasgow prognostic score in patients with incurable stage IV colorectal cancer[J]. Am J Surg, 2013, 206(2): 234-240.
- [3] PFEFFER S, AIVAZIAN D. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(11): 886-896.
- [4] LI W H, HU Y S, JIANG T, et al. Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64 [J]. APMIS, 2014, 122 (11): 1080-1087.
- [5] CHEN T C, HSIEH C H, SARNOW P. Supporting role for GTPase Rab27a in hepatitis C virus RNA replication through a novel miR-122-mediated effect[J]. PLoS Pathog, 2015, 11 (8): e1005116.
- [6] FENG F X, ZHANG J P, FAN X X, et al. Downregulation of Rab27A contributes to metformin-induced suppression of breast cancer stem cells [J]. Oncol Lett, 2017, 14 (3): 2947-2953.
- [7] DORAYAPPAN K D P, WANNER R, WALLBILICH J J, et al. Hypoxia-induced exosomes contribute to a more aggressive and chemoresistant ovarian cancer phenotype: a novel mechanism linking STAT3/Rab proteins [J]. Oncogene, 2018, 37(28):3806-3821.
- [8] GOISHI K, MIZUNO K, NAKANISHI H, et al. Involvement of Rab27 in antigen-induced histamine release from rat basophilic leukemia 2H3 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(1):294-301.
- [9] CAO C W, LU C H, XU J, et al. Expression of Rab25 correlates with the invasion and metastasis of gastric cancer [J]. Chin J Cancer Res, 2013, 25: 192-199.
- [10] ZHAO M, YIN Y X, GUO F, et al. Increased Rab25 expression is not correlated with peritoneal metastasis of ovarian cancers[J]. Cancer Invest, 2012, 30(9): 683-687.
- [11] WIESNER C, EL AZZOUZI K, LINDER S. A specific subset of RabGTPases controls cell surface exposure of MT1-MMP, extracellular matrix degradation and three-dimensional invasion of macrophages[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 13): 2820-2833.
- [12] BRAVO-CORDERO J J, CORDANI M, SORIANO S F, et al. A novel high-content analysis tool reveals Rab8-driven cytoskeletal reorganization through Rho GTPases, calpain and MT1-MMP[J]. J Cell Sci, 2016, 129(8):1734-1749.
- [13] SINHA S, HOSHINO D, HONG N H, et al. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics[J]. J Cell Biol, 2016, 214(2): 197-213.
- [14] HUANG Z, FENG Y. Exosomes derived from hypoxic colorectal cancer cells promote angiogenesis through Wnt4-induced β -catenin signaling in endothelial cells [J]. Oncol Res, 2017, 25(5): 651-661.
- [15] WORST T S, MEYER Y, GOTTSCHALT M, et al. RAB27A, RAB27B and VPS36 are downregulated in advanced prostate cancer and show functional relevance in prostate cancer cell[J]. Int J Oncol, 2017, 50(3):920-932.
- [16] WANG J S, WANG F B, ZHANG Q G, et al. Enhanced expression of Rab27A gene by breast cancer cells promoting invasiveness and the metastasis potential by secretion of insulin-like growth factor-Ⅱ [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6 (3):372-382.
- [17] CHANG C, LIU T, HUANG Y, et al. MicroRNA-134-3p is a novel potential inhibitor of human ovarian cancer stem cells by targeting RAB27A[J]. Gene, 2017, 605:99-107.
- [18] BOUCHER J M, CLARK R P, CHONG D C, et al. Dynamic alterations in decoy VEGF receptor-1 stability regulate angiogenesis[J]. Nat Commun, 2017, 8: 15699.

[本文编辑] 翟铖铖