

## Rab27b 在结直肠癌中的表达情况及临床意义

倪沂江<sup>1</sup>, 秦 辉<sup>2</sup>, 汤黎明<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属常州第二人民医院创伤外科,<sup>2</sup>重症监护科,<sup>3</sup>胃肠外科,江苏 常州 213000)

**[摘要]** 目的:检测 Rab27b 在结直肠癌中的表达情况,并探讨 Rab27b 表达与结直肠癌中重要临床指标尤其是临床预后之间的关系。方法:在组织芯片上(80 例肠癌标本及 20 例癌旁对照标本)进行免疫组化检测,使用 Cox 回归法及 Kaplan-Meier 生存分析法进行结直肠癌患者的预后分析。结果:免疫组化结果显示结直肠癌中的 Rab27b 表达明显高于癌旁对照组 Rab27b 的表达( $P=0.041$ )。Rab27b 的表达与结直肠癌患者的性别( $P=0.012$ )、血清 CEA 水平( $P=0.014$ )、远处转移( $P=0.021$ )及 TNM 分期( $P=0.013$ )有重要关联。生存分析显示 Rab27b 表达( $P=0.021$ )与结直肠癌患者预后关系密切,Rab27b 高表达提示预后不良。结论:Rab27b 在结直肠癌组织中异常高表达,且 Rab27b 的表达与结直肠癌的数种恶性表型相关。Rab27b 可作为结直肠癌患者预后的独立危险因素。

**[关键词]** 结直肠癌;Rab27b;预后

**[中图分类号]** R735.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)10-1405-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20151015

## Expression and clinical significance of Rab27b in colorectal cancer

Ni Yijiang<sup>1</sup>, Qin Hui<sup>2</sup>, Tan Liming<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Traumatic Surgery,<sup>2</sup>Department of Intensive Care Medicine, <sup>3</sup>Department of Gastrointestinal Surgery, Changzhou No. 2 People's Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To detect the expression of Rab27b in human colorectal cancer(CRC) and investigate the relationship between Rab27b expression and clinical characteristics, especially the prognosis of CRC. **Methods:** Immunohistochemistry analysis by tissue microarrays (80 CRC samples and 20 tumor-adjacent tissue samples) was performed to characterize Rab27b expression in CRC. Cox regression and Kaplan-Meier survival analyses were carried out to evaluate the prognosis of CRC. **Results:** Immunohistochemistry analysis showed that the expression of Rab27b in CRC was significantly higher than that in normal tumor-adjacent tissues ( $P = 0.041$ ). Moreover, the expression level of Rab27b protein in CRC was significantly related to gender ( $P = 0.012$ ), serum CEA level ( $P = 0.014$ ), distant metastasis ( $P = 0.021$ ) and TNM stage ( $P = 0.013$ ). COX multi-factor analysis showed that Rab27b expression ( $P = 0.021$ ) could be recognized as an independent prognosis factor for CRC. **Conclusion:** Rab27b expression was abnormally highly expressed and correlated with malignant phenotypes of CRC. It may serve as a novel prognostic factor for CRC.

**[Key words]** colorectal cancer; Rab27b; prognosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1405-1408]

结直肠癌是消化系统常见肿瘤之一,其致死率在欧洲及美国肿瘤相关病死率中排第 2 位<sup>[1]</sup>。虽然中国结直肠癌发病率低于西方国家,但近年来其发病率亦明显增高,占恶性肿瘤病死率第 3 位<sup>[2]</sup>。结直肠癌生存情况与肿瘤分期分级关系密切,对于进展期或伴有手术无法切除转移病灶的结直肠癌患者,

其 5 年生存率仅为 5%<sup>[3-4]</sup>。虽然改良手术方法及新型化疗治疗方案层出不穷,结直肠癌的总体 5 年生存率无显著改变<sup>[5]</sup>。许多结直肠癌相关的临床难题如远处转移,抗药性增加等仍未解决,寻找新的与结直肠癌转移及预后相关的蛋白标志物显得尤为重要。Rab27b 为 Ras 样小 GTP 酶 Rab 家族成员,正常表达于多种分泌细胞并通过调节 Rab27 效应器调控相关分泌通路<sup>[6-7]</sup>。有文献报道,Rab27b 功能繁多且与多种肿瘤发生发展关系密切。如 Rab27b 促进乳腺癌细

**[基金项目]** 南京医科大学肿瘤中心招标课题(11ZLKF06)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:drtanglm@gmail.com

胞生长及增加肿瘤转移能力<sup>[8-9]</sup>;Rab27b 表达与乳腺癌及肝癌预后关系密切<sup>[10-11]</sup>。本研究采用免疫组化检测 80 例结直肠癌组织和 20 例肠黏膜正常上皮组织中 Rab27b 表达情况,并探讨其与直肠癌患者重要临床特征尤其是预后指标的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选取南通大学附属医院 2006—2008 年收治入院的 80 例结直肠癌患者肿瘤组织(肿瘤组),20 例肠黏膜正常上皮组织(癌旁组,距肿瘤切缘>0.5 cm)。肿瘤组中 80 例标本均经术后病理证实,癌旁组黏膜组织亦经病理证实为炎症或正常黏膜。全部病例术前均未行放疗、化疗,临床资料完整。所有临床数据及资料经患者同意用于科学研究并签署知情同意书。

### 1.2 方法

在组织芯片上(80 例肠癌标本及 20 例癌旁对照标本)进行免疫组化检测,组织芯片由西安艾莉娜生物有限公司制备,Rab27b 抗体购自美国 Abcam 公司,免疫组化 SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;严格按照免疫组化试剂盒说明的步骤进行,其中一抗浓度 1:100。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

免疫组化结果判读:分别测量 Rab27b 阳性染色细胞数百分比及染色强度<sup>[12]</sup>。采用免疫组化评分法(immunohistochemical scores, IHS),分别计数阳性细胞百分比(无阳性细胞为 0,阳性细胞占 1%~10%为 1,11%~50%为 2,51%~80%为 3,81%~100%为 4)和评判阳性细胞染色强度(阴性=0,弱阳性=1,中阳性=2,强阳性=3),两者的乘积即为该切片的 IHS。IHS≤4 分为低表达或不表达,IHS>4 分为高表达。

### 1.3 统计学方法

所有数据结果经 Excel 整理,应用 SPSS16.0 统计软件进行处理。计数资料采用  $\chi^2$  检验,单因素(univariate)及多因素(multivariate)比例风险回归模型用于评估预后相关因素,Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 结直肠癌患者临床资料概述

80 例结直肠癌患者,其中男 49 例,女 31 例,年龄 42~87 岁;肿瘤直径  $\geq 5$  cm 者 38 例,<5 cm 者 40 例;结肠癌 48 例,直肠癌 31 例,回盲部癌 1 例;腺癌 70 例,非腺癌 10 例;中高分化癌 66 例,低分化

癌 10 例;淋巴结转移 32 例,远处转移 5 例;TNM 分期(UICC2002) I~II 期 45 例,III~IV 期 35 例;随访时间为 1~71 个月,平均 49 个月;80 例中死亡 40 例,存活 40 例。

### 2.2 免疫组化检测

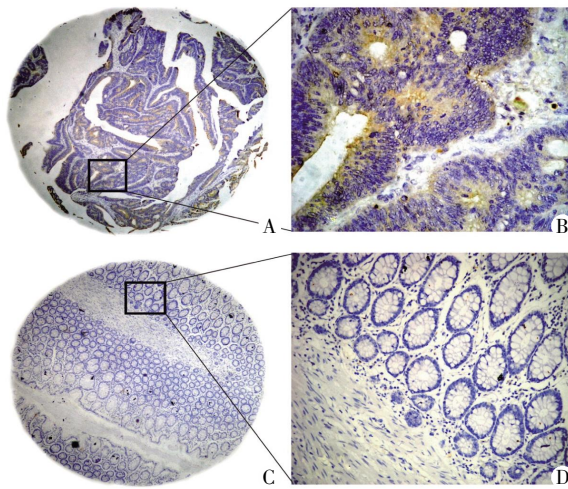
免疫组化结果显示 80 例肿瘤组患者中,有 40 例(50.0%)Rab27b 高表达,表达产物主要位于肿瘤细胞胞浆(图 1);对比癌旁组病例,仅有 4 例(20.0%)显示 Rab27b 高表达,其差异有统计学意义( $\chi^2 = 5.84, P=0.016$ )。

### 2.3 Rab27b 与结直肠癌临床特征的关系

Rab27b 的表达与结直肠癌以下临床指标有重要关联:性别( $P=0.012$ )、血清 CEA 水平( $P=0.014$ )、远处转移( $P=0.021$ )及 TNM 分期( $P=0.013$ ,表 1)。

表 1 Rab27b 表达与 80 例肠癌患者临床指标关系  
Table 1 Correlation of Rab27b expression with clinicopathological characteristics of 80 CRC patients

组别	Rab27 表达情况[n(%)]		$\chi^2$ 值	P 值
	例数	高		
性别			6.37	0.012
男	49	30(61.2)	19(38.8)	
女	31	10(32.3)	21(67.7)	
年龄(岁)			0.06	0.813
≤60	53	27(50.9)	26(49.1)	
>60	27	13(48.1)	14(51.9)	
肿瘤大小(cm)			2.50	0.114
≥5	38	22(57.9)	16(42.1)	
<5	40	16(40.0)	24(60.0)	
肿瘤部位			1.03	0.597
结肠	48	24(50.0)	24(50.0)	
直肠	31	15(48.4)	16(51.6)	
回盲连接部	1	1(100.0)	0(0.0)	
组织学类型			0.46	0.499
腺癌	70	34(48.6)	36(51.4)	
非腺癌	10	6(60.0)	4(40.0)	
肿瘤分化			0.59	0.442
中高分化	66	31(47.0)	35(53.0)	
低分化	10	6(60.0)	4(40.0)	
血清 CEA 水平(ng/mL)			6.04	0.014
≥15	10	8(80.0)	2(20.0)	
<15	48	18(37.5)	30(62.5)	
淋巴结转移			1.88	0.171
是	32	19(59.4)	13(40.6)	
否	48	21(43.8)	27(56.2)	
远处转移			5.33	0.021
是	5	5(100.0)	0(0.0)	
否	75	35(46.7)	40(53.3)	
TNM 分期			6.15	0.013
I~II 期	45	17(37.8)	28(62.2)	
III~IV 期	35	23(65.7)	12(34.3)	



A、B: Rab27b 在结直肠癌中显著高表达, 表达产物主要位于肿瘤细胞胞浆; C、D: 对比癌旁组病例, Rab27b 在正常肠黏膜上皮组织中不表达。A、C: ×40; B、D: ×400。

图 1 Rab27b 在结直肠癌组织中高表达而在正常肠黏膜上皮组织中不表达

Figure 1 High Rab27b expression in the cytoplasm of colorectal cancer(CRC) cells; while no Rab27b expression in the epithelium of non-cancerous intestinal mucosa cells

### 2.4 生存分析

单因素比例风险回归模型用于评估预后相关因素为 Rab27b 表达 ( $P=0.009$ ), 肿瘤分化程度 ( $P=0.005$ )、血清 CEA 水平 ( $P=0.023$ ) 及远处转移 ( $P=0.006$ , 表 2)。多因素回归模型进一步证明 Rab27b 表达 ( $P=0.021$ )、肿瘤分化程度 ( $P=0.032$ ) 及远处转移 ( $P=0.042$ ) 是 80 例结直肠癌患者预后相关的独立因素(表 3)。Kaplan-Meier 生存曲线提示伴有 Rab27b 高表达、肿瘤低分化及远处转移的结直肠癌患者生存时间明显降低(图 2)。

### 3 讨论

近年来, 多个 Rab 家族成员被发现与肿瘤形成与发展关系密切。如 Rab25 在卵巢癌和乳腺癌中可

表 2 单因素比例风险回归模型筛选预后相关因素

Table 2 Univariate analyses of prognostic factors for overall survival

	单因素生存分析		
	HR	P 值	95% CI
Rab27b 表达	2.65	0.009	1.28~5.47
性别	2.03	0.070	0.94~4.38
年龄(岁)	1.45	0.344	0.67~3.11
肿瘤大小(cm)	1.24	0.542	0.62~2.51
肿瘤部位	1.10	0.782	0.57~2.12
组织学类型	2.55	0.200	0.61~10.64
肿瘤分化	0.30	0.005	0.13~0.70
血清 CEA 水平(ng/mL)	2.77	0.023	1.15~6.67
淋巴结转移	1.47	0.274	0.74~2.91
远处转移	4.46	0.006	1.55~12.87
TNM 分期	1.68	0.138	0.30~1.18

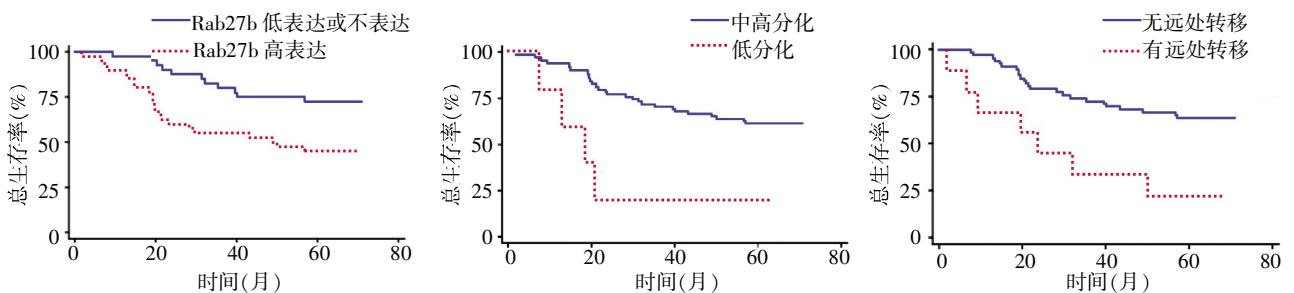
表 3 多因素回归模型筛选预后相关因素

Table 3 Multivariate analyses of prognostic factors for overall survival

	多因素生存分析		
	HR	P 值	95% CI
Rab27b 表达	2.92	0.021	1.17~7.27
肿瘤分化	0.30	0.032	0.10~0.90
淋巴结转移	1.53	0.400	0.57~4.10
远处转移	4.38	0.042	1.06~18.17

抑制肿瘤细胞凋亡及促进肿瘤细胞增殖<sup>[13-14]</sup>; Rab23 在胃癌中表达异常并在肿瘤侵袭中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。

类似地, Rab27b 在 ER 阳性的乳腺癌中可显著促进肿瘤增长并与预后不良密切相关<sup>[8-9]</sup>。在肝癌中 Rab27b 是独立的预后指标之一<sup>[11]</sup>。有研究者提出 Rab27b、热休克蛋白 90a(Hsp90a) 及金属基质蛋白酶 2(MMP2) 之间可能存在相互关系。Hsp90a 可在 Rab27b 存在的特定胞内环境下分泌, 而 MMP2 的激活又依赖胞外 Rab27b 的活性。目前已知 Hsp90a 和 MMP2 均在肿瘤发生发展中发挥重要作用, 因此我们推测 Rab27b 在结直肠癌中可能存在异常表达且



A: Rab27b 高表达的结直肠癌患者(虚线)预后明显较 Rab27b 低表达或不表达(实线)为差; B: 低分化的结直肠癌患者(虚线)预后明显较高分化(实线)的差; C: 有远处转移的结直肠癌患者(虚线)预后明显较无远处转移(实线)的差。

图 2 Kaplan-Meier 生存曲线  
Figure 2 Kaplan-Meier curves

在结直肠癌的发生发展过程中发挥特定作用。

本研究中,课题组收集了 80 例结直肠癌标本(肿瘤组)及 20 例癌旁正常组织标本(癌旁组),制作组织芯片,使用免疫组化法检测 Rab27b 在结直肠癌中的表达情况。结果与前述研究类似,结直肠癌中亦发现了 Rab27b 蛋白的异常高表达,结直肠癌组中 Rab27b 的表达量明显高于其在癌旁对照组的表达。众所周知肿瘤的转移与病死率密切相关。对结直肠癌患者而言,淋巴结转移和远处转移是生存率低下的主要因素<sup>[5]</sup>。本研究通过  $\chi^2$  检验,发现 Rab27b 的高表达和结直肠癌的远处转移密切相关,Rab27b 可作为转移情况的预测指标之一。此外,Rab27b 的高表达还与其他重要临床指标相关,如血清 CEA 水平及 TNM 分期。此结果和前述研究数据相仿,Rab27b 具有致癌基因的某些特性,可促进肿瘤生长,加快肿瘤侵袭<sup>[16-17]</sup>。

此后,课题组又采用单因素及多因素比例风险回归模型评估本研究中 80 例结直肠癌患者的预后相关因素。Rab27b 再次被明确为独立的预后指标之一,Rab27b 高表达提示结直肠癌患者预后不良,这与 Rab27b 在多种其他肿瘤如乳腺癌<sup>[12]</sup>、肝癌<sup>[13]</sup>、胶质瘤<sup>[18]</sup>中的特性相似。

综上所述,本研究报道了 Rab27b 在结直肠癌组织中异常高表达,且 Rab27b 表达与结直肠癌患者的数种恶性表型相关。Rab27b 可作为结直肠癌患者预后的独立危险因素,Rab27b 为结直肠癌患者的病情诊断及靶向治疗提供了可能的方向。

#### [参考文献]

- [1] Zhou T,Zhang GJ,Zhou H,et al. Overexpression of microRNA-183 in human colorectal cancer and its clinical significance[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2014,26(2):229-233
- [2] Xu AG,Yu ZJ,Jiang B,et al. Colorectal cancer in Guangdong Province of China:a demographic and anatomic survey[J]. World J Gastroenterol,2010,16(8):960-965
- [3] Fang YJ,Wu XJ,Zhao Q,et al. Hospital-based colorectal cancer survival trend of different tumor locations from 1960s to 2000s[J]. PLoS One,2013,8(9):e73528
- [4] Nitsche U,Maak M,Schuster T,et al. Prediction of prognosis is not improved by the seventh and latest edition of the TNM classification for colorectal cancer in a single-center collective[J]. Ann Surg,2011,254(5):793-800
- [5] Zhao L,Wang H,Deng YJ,et al. Transgelin as a suppressor is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma patients[J]. Mod Pathol,2009,22(6):786-796
- [6] Barr F,Lambright DG. Rab GEFs and GAPs[J]. Curr Opin Cell Biol,2010,22(4):461-470
- [7] Johnson JL,Brzezinska AA,Tolmachova T,et al. Rab27a and Rab27b regulate neutrophil azurophilic granule exocytosis and NADPH oxidase activity by independent mechanisms[J]. Traffic,2010,11(4):533-547
- [8] Hendrix A,Braems G,Bracke M,et al. The secretory small GTPase Rab27B as a marker for breast cancer progression[J]. Oncotarget,2010,1(4):304-308
- [9] Hendrix A,Maynard D,Pauwels P,et al. Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion,and metastasis [J]. J Natl Cancer Inst,2010,102(12):866-880
- [10] Zhang JX,Huang XX,Cai MB,et al. Overexpression of the secretory small GTPase Rab27B in human breast cancer correlates closely with lymph node metastasis and predicts poor prognosis[J]. J Transl Med,2012,10:242
- [11] Dong WW,Mou Q,Chen J,et al. Differential expression of Rab27A/B correlates with clinical outcome in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol,2012,18(15):1806-1813
- [12] Fu M,Gu X,Ni H,et al. High expression of inositol polyphosphate phosphatase-like 1 associates with unfavorable survival in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol,2013,6(11):2515-2522
- [13] Fan Y,Xin XY,Chen BL,et al. Knockdown of RAB25 expression by RNAi inhibits growth of human epithelial ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Pathology 2006,38(6):561-567
- [14] Cheng KW,Lahad JP,Kuo WL,et al. The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers[J]. Nat Med,2004,10(11):1251-1256
- [15] Hou Q,Wu YH,Grabsch H,et al. Integrative genomics identifies RAB23 as an invasion mediator gene in diffuse-type gastric cancer[J]. Cancer Res,2008,68(12):4623-4630
- [16] Mignot G,Chalmin F,Ladoire S,et al. Tumor exosome-mediated MDSC activation[J]. Am J Pathol,2011,178(3):1403-1404
- [17] Cho JA,Park H,Lim EH,et al. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells[J]. Int J Oncol,2012,40(1):130-138
- [18] Wang H,Wang Y,Bao Z,et al. Hypomethylated Rab27b is a progression-associated prognostic biomarker of glioma regulating MMP-9 to promote invasion [J]. Oncol Rep,2015,34(3):1503-1509

[收稿日期] 2015-06-26