

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.24.006  
文章编号: 1005-8982 (2019) 24-0032-06

## Rab3IP 对食管癌患者预后的评估价值\*

张岚<sup>1</sup>, 周利娟<sup>2</sup>, 肖旭阳<sup>1</sup>

(1. 锦州医科大学附属第一医院 胸外科, 辽宁 锦州 121000; 2. 锦州医科大学 护理学院, 辽宁 锦州 121000)

**摘要: 目的** 探讨 Rab3A 相互作用蛋白 (Rab3IP) 在食管癌组织中的表达, 并分析其与临床资料及预后的关系。**方法** 采用免疫组织化学染色和 Western blotting 检测 Rab3IP 在 109 例食管癌组织及其癌旁组织中的表达, 分析 Rab3IP 表达方式与临床病理特征的关系; 用 Kaplan-Meier 法分析 Rab3IP 表达与食管癌患者总体生存期和无瘤生存期的关系, Cox 比例风险模型分析影响患者生存预后的因素。**结果** 癌组织 Rab3IP 高表达率高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ), 癌组织 Rab3IP 相对表达量高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ )。两组患者肿瘤直径、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。单因素和多因素分析显示, Rab3IP 表达是影响食管癌患者术后总体生存时间的独立预后因素 ( $P < 0.05$ ), 低表达组术后总体生存时间高于高表达组 ( $P < 0.05$ )。Rab3IP 表达是影响食管癌患者术后无瘤生存时间的独立预后因素 ( $P < 0.05$ ), 低表达组术后无瘤生存时间高于高表达组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 食管癌组织 Rab3IP 呈高表达, Rab3IP 可作为食管癌预后评估的指标。

**关键词:** 食管肿瘤; 免疫组织化学; 预后

**中图分类号:** R735.1

**文献标识码:** A

## Prognostic potential of Rab3A interacting protein expression in patients with esophageal cancer\*

Lan Zhang<sup>1</sup>, Li-juan Zhou<sup>2</sup>, Xu-yang Xiao<sup>1</sup>

(1. Department of Thoracic Surgery, The first affiliated hospital of Jinzhou Medical University, Liaoning 121000 China; 2. College of Nursing, Jinzhou Medical University, Liaoning 121000, China)

**Abstract: Objective** To detect the expressions of Rab3A interacting protein (Rab3IP) in esophageal cancer tissues and to explore their correlations with the clinicopathological features and prognosis of the patients. **Methods** The expressions of Rab3IP in 109 esophageal cancer tissues and paired adjacent tissues was detected using immunohistochemical staining and western blot, respectively. The correlations of different patterns of Rab3IP expressions with the clinicopathological features of the patients were analyzed. Kaplan-Meier survival analysis was used to analyze the over-all survival and recurrence-free survival of the patients in relation with Rab3IP expressions. Cox regression were applied to analyse its prognostic value. **Results** Rab3IP were highly expressed in 70.6% (77/109) in the esophageal cancer tissues compared to their paired adjacent tissues 52.3% (57/109), the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The expression of TRab3IP were correlated with tumor size, invasion depth, lymph node metastasis, and TNM staging ( $P < 0.05$ ). Univariate and multivariate analysis showed that the expression of Rab3ip was an independent prognostic factor for overall survival time of esophageal cancer patients after operation ( $P < 0.05$ ), and the overall survival time of low expression group was higher than that of high expression group ( $P < 0.05$ ). The expression of rab3ip protein was an independent prognostic factor for tumor-free

收稿日期: 2019-06-27

\* 基金项目: 辽宁省科学技术计划 (No: 201602327)

survival time in patients with esophageal cancer ( $P < 0.05$ ), and the tumor free survival time in the low expression group was higher than that in the high expression group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Rab3IP are high expression in esophageal cancer tissues and can serve as new prognostic biomarkers for esophageal cancer.

**Keywords:** esophageal neoplasms; immunohistochemistry; prognosis

尽管近 20 年来癌症治疗技术得到了快速发展, 但是食管癌患者预后依然不甚理想, 我国食管癌 5 年生存率仅为 30%<sup>[1-3]</sup>。寻找有效指标用于判断患者预后具有重要意义。Rab3A 相互作用蛋白 (Rab3A interacting protein, Rab3IP) 首次在 Hela 细胞中发现, 与 SSX2 共同锚定于细胞核, 与肿瘤细胞的形成密切相关。有研究发现胃癌、涎腺癌组织中 Rab3IP 表达明显上调, 并且与患者不良预后密切相关<sup>[4-5]</sup>。本研究通过分析 Rab3IP 表达与食管癌患者临床资料的关系, 探讨 Rab3IP 对食管癌预后的预测价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2013 年 7 月—2018 年 7 月于锦州医科大学附属第一医院行食管癌根治性切除术的 109 例食管癌患者。所有患者经术后病理学证实为食管癌, 术前未行放疗或其他抗癌治疗, 临床资料完整, 有随访记录。排除围手术期严重并发症或术中死亡患者。其中男性 62 例, 女性 47 例; 年龄 45 ~ 79 岁, 平均 ( $61.17 \pm 7.15$ ) 岁。患者临床分期参考国际抗癌联盟与美国癌症联合会食管癌病理分期标准 (第 8 版)<sup>[6]</sup>, I、II 及 III 期患者分别有 15、35 及 59 例。本研究经本院医学伦理委员会批准, 患者术前均被详细告知手术风险和受益, 并自愿签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 样本采集** 所有患者术中同时切取癌组织及其癌旁组织, 癌组织为距肿瘤切缘  $< 1$  cm, 病理证实为食管癌组织; 癌旁组织为距肿瘤切缘  $\geq 2$  cm, 病理证实为正常食管组织。样本组织取出后, 立即置于液氮冷冻, 再置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

**1.2.2 免疫组织化学法** 取出样本组织, 自然融化, 4% 多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 制成  $5\ \mu\text{m}$  切片。切片常规脱蜡、水化后, 加入 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 微波加热抗原修复, 10% 正常羊血清孵育 20 min。滴加兔抗人 RAB3IP 多克隆抗体 (1 : 100, 美国 Abcam 公司),  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中过夜。次日磷酸盐缓冲液振荡清洗后滴加生物素标记山羊抗

兔免疫球蛋白 G 抗体 (上海碧云天生物技术研究所, 二抗), 孵育 1 h, DAB 显色, 苏木精复染, 常规脱水、透明后, 中性树脂封片。由 2 位病理科医生阅片, 染色半定量分析 Rab3IP 表达, 染色强度: 无染色计 0 分, 淡黄色计 1 分, 棕黄色计 2 分, 棕褐色计 3 分。阳性细胞所占面积比: 无阳性细胞计 0 分,  $> 0\% \sim 10\%$  计 1 分,  $> 10\% \sim 50\%$  计 2 分,  $> 50\%$  计 3 分。将染色强度与阳性细胞所占面积比之积为最终染色评分, Rab3IP 评分  $\leq 3$  分为低表达,  $> 3$  分为高表达, 并分别作为低表达组和高表达组。

**1.2.3 Western blotting** 从 109 份食管癌组织和配对的癌旁组织中随机选择 3 份进行 Western blotting 检测。取约 200 mg 样本组织, 冰浴上打成匀浆,  $4^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, BCA 法检测蛋白含量。加入上样缓冲液将蛋白煮沸 5 min 变性, 取  $50\ \mu\text{g}$  总蛋白 SDS-PAGE 电泳分离, 电泳后半干法转移至 PVDF, 5% 脱脂奶粉孵育 2 h。PBST 洗膜后加入 Rab3IP 抗体 (1 : 250, 美国 Abcam 公司),  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 1 000, 武汉博士德生物工程公司) 振荡孵育 2 h, 回收二抗, TBST 洗膜 3 次, 用伯乐凝胶成像仪进行条带成像与分析。

**1.2.4 资料收集** 收集患者临床资料, 包括性别、年龄、肿瘤大小、病灶部位、分化程度、侵袭深度、淋巴结转移及 TNM 分期等。查阅患者随访资料, 术后患者进行常规随访, 术后第 1 ~ 2 年每 3 个月随访 1 次; 术后 3 ~ 5 年每 6 个月随访 1 次。生存时间从手术当天开始计算, 截止日期为死亡日期或未次随访日期, 本研究随访截止日期为 2018 年 7 月 31 日。记录患者总生存时间和无瘤生存时间。

### 1.3 统计学方法

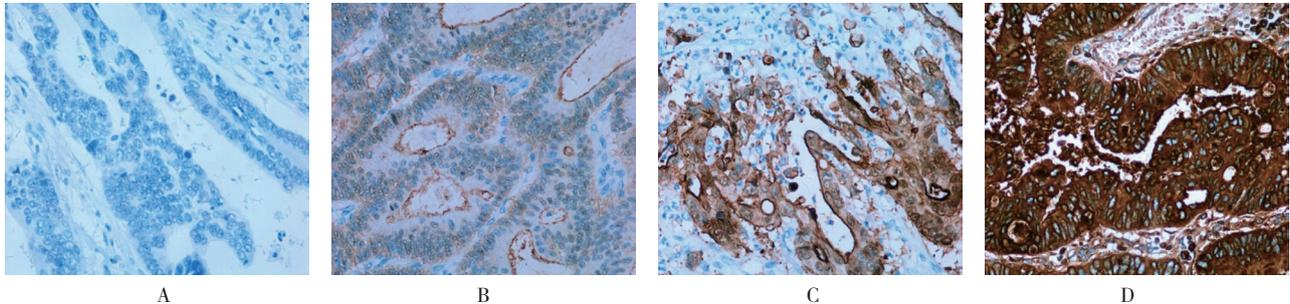
数据分析采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 7.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用独立样本  $t$  检验; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用  $\chi^2$  检验; Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 比较用 Log-rank  $\chi^2$  检验; 影响因素分析用 Cox 比例风险模型,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 食管癌组织和癌旁组织中 Rab3IP 的表达

Rab3IP 表达于细胞质，阳性蛋白被染成棕色或

棕褐色颗粒。食管癌组织 Rab3IP 高表达率为 70.6% (77/109)，癌旁组织为 52.3% (57/109)，经  $\chi^2$  检验，差异有统计学意义 ( $\chi^2=7.747, P=0.005$ )，癌组织高于癌旁组织。见图 1。



A: 癌旁组织 Rab3IP 阴性表达; B: 食管癌组织中 Rab3IP 低表达; C: 食管癌组织 Rab3IP 中等表达; D: 食管癌组织 Rab3IP 高表达

图 1 Rab3IP 在食管癌和癌旁组织中的表达 (免疫组织化学  $\times 200$ )

### 2.2 Rab3IP 在食管癌和癌旁组织中的表达

食管癌组织 Rab3IP 相对表达量为 ( $0.718 \pm 0.018$ )，癌旁组织为 ( $0.236 \pm 0.013$ )，经独立样本  $t$  检验，差异有统计学意义 ( $t=37.599, P=0.000$ )，癌组织高于癌旁组织。见图 2。

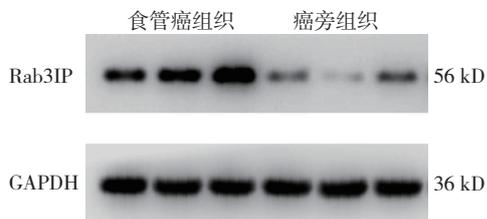


图 2 Rab3IP 在食管癌和癌旁组织中的表达

### 2.3 两组患者不同因素的 Rab3IP 阳性率比较

两组患者不同肿瘤直径、浸润深度、有无淋巴结转移及 TNM 分期的 Rab3IP 阳性率比较，经  $\chi^2$  检验，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.4 影响食管癌患者总生存时间的单因素和多因素分析

单因素和多因素分析显示，Rab3IP 表达是影响食管癌患者术后总生存时间的独立预后因素 ( $P < 0.05$ )。Rab3IP 高表达组患者术后 3 年总生存率为 42.1%，低表达组为 70.6%，经 Log rank  $\chi^2$  检验，差异有统计学意义 ( $\chi^2=5.027, P=0.025$ )，低表达组高于高表达组。见表 2 和图 3A。

表 1 两组患者不同因素的 Rab3IP 阳性率比较 例

组别	n	年龄		男 / 女 / 例	肿瘤直径		肿瘤位置		
		$\geq 60$ 岁	$< 60$ 岁		$\geq 5$ cm	$< 5$ cm	上段	中段	下段
低表达组	32	17	15	16/16	17	15	5	14	13
高表达组	77	40	37	46/31	66	11	10	34	33
$\chi^2$ 值		0.013		0.874	13.218		0.140		
P 值		0.911		0.350	0.000		0.918		

组别	n	分化程度			浸润深度			淋巴结转移		TNM 分期	
		高	中	低	pT <sub>1</sub>	pT <sub>2</sub>	pT <sub>3</sub>	有	无	I、II 期	III 期
低表达组	32	6	20	6	11	6	15	10	22	24	8
高表达组	77	14	49	14	7	4	66	52	25	26	51
$\chi^2$ 值		0.013			15.304			12.133		15.479	
P 值		0.994			0.000			0.000		0.000	

2.5 影响食管癌患者无瘤生存时间的单因素和多因素分析

Rab3IP 表达是影响食管癌患者术后无瘤生存时间的独立预后因素 ( $P < 0.05$ )。Rab3IP 高表达

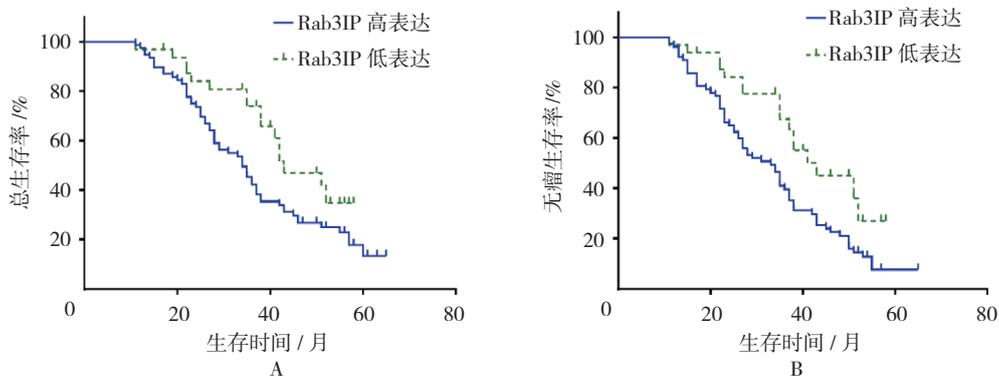
组患者术后 3 年无瘤生存率为 39.5%，低表达组为 67.5%，经 Log rank  $\chi^2$  检验，差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 7.275, P = 0.007$ )，低表达组高于高表达组。见表 3 和图 3B。

表 2 影响食管癌患者总生存时间的单因素和多因素分析参数

变量	单因素分析				多因素分析			
	$\hat{RR}$	95% CI		P 值	$\hat{RR}$	95% CI		P 值
		下限	上限			下限	上限	
年龄	1.506	0.946	2.397	0.084	1.478	0.884	2.468	0.136
性别	1.091	0.691	1.724	0.709	1.136	0.703	1.836	0.602
肿瘤直径	1.285	0.738	2.238	0.375	1.010	0.543	1.879	0.975
肿瘤位置	1.369	0.692	2.710	0.367	1.027	0.484	2.181	0.945
分化程度	0.822	0.458	1.475	0.511	0.699	0.375	1.302	0.259
浸润深度	0.720	0.377	1.374	0.319	0.930	0.440	1.966	0.848
淋巴结转移	1.113	0.703	1.762	0.647	0.695	0.401	1.202	0.193
TNM 分期	0.677	0.426	1.077	0.099	0.785	0.452	1.364	0.391
Rab3IP 表达	1.849	1.061	3.223	0.030	2.213	1.016	4.823	0.046

表 3 影响食管癌患者无瘤生存时间的单因素和多因素分析参数

变量	单因素分析				多因素分析			
	$\hat{RR}$	95% CI		P 值	$\hat{RR}$	95% CI		P 值
		下限	上限			下限	上限	
年龄	1.355	0.877	2.094	0.171	1.356	0.838	2.194	0.216
性别	1.303	0.839	2.024	0.239	1.283	0.807	2.039	0.292
肿瘤直径	1.308	0.767	2.230	0.325	1.232	0.671	2.265	0.500
肿瘤位置	1.225	0.632	2.375	0.549	0.987	0.471	2.069	0.972
分化程度	0.663	0.388	1.134	0.134	0.468	0.258	0.849	0.083
浸润深度	0.736	0.404	1.339	0.315	0.786	0.386	1.600	0.507
淋巴结转移	1.101	0.710	1.709	0.667	0.862	0.514	1.447	0.575
TNM 分期	1.373	0.887	2.124	0.155	0.834	0.498	1.395	0.489
Rab3IP 表达	2.017	1.183	3.442	0.010	2.181	1.056	4.504	0.035



A: Rab3IP 表达与食管癌患者总生存时间的关系; B: Rab3IP 表达与食管癌患者无瘤生存时间的关系。

图 3 食管癌患者 Rab3IP 表达的生存曲线

### 3 讨论

Rab 蛋白属于 GTPase 的 Ras 超家族蛋白成员,主要通过胞吞和胞吐的方式参与囊泡的运输,与细胞器之间的胞内蛋白运输有关<sup>[7]</sup>。尽管 Rab 蛋白的结构高度保守,其功能特异性高,但是当某些结构发生突变时,可导致蛋白运输错误,进而诱发某些疾病,如 Rab27a 的双半胱氨酸异戊烯变成单半胱氨酸异戊烯时,使黑色素小体无法运输至高尔基体,导致格里塞利综合征<sup>[8]</sup>。Rab 结构突变不仅与基因遗传病有关,还参与肿瘤的发生和进展。有研究显示,结肠癌组织 Rab25 蛋白呈显著高表达,敲低 Rab11 表达可以抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭表型, Rab2A 可部分逆转 miR-186-5p 诱导的乳腺癌细胞增殖能力减弱<sup>[9-10]</sup>。Rab3IP 是近年发现的 Rab 蛋白家族新成员,其作为 Rab 蛋白的主要激活蛋白,通过影响胞内运输过程和细胞骨架重构等参与多种疾病的发生<sup>[11]</sup>。

Rab3IP 与恶性肿瘤的发生有关,有研究表明, Rab3IP 可能通过调控上皮-间质转化过程参与肿瘤细胞的侵袭和转移,并介导肿瘤患者的不良预后<sup>[12]</sup>。HUR 等<sup>[13]</sup>发现 Rab3IP 可被逆转录转座子 LINE-1 激活,并参与结直肠癌的转移, Rab3IP 表达升高与结直肠癌的不良预后有关。本研究首次检测了食管癌组织 Rab3IP 的表达,结果显示癌组织 Rab3IP 表达明显高于癌旁组织,并且 Rab3IP 高表达与肿瘤直径、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有关,提示高表达 Rab3IP 可能使食管癌细胞侵袭和转移能力增强。目前对 Rab 在肿瘤中的作用尚处于初步研究阶段,有学者认为 Rab3IP 对囊泡转运的调控作用可能通过天然免疫调节影响肿瘤进程的多个环节<sup>[14]</sup>。此外 Rab 蛋白促进了肿瘤细胞和基质细胞间的信号转导,为肿瘤细胞增殖和侵袭提供了有利的微环境<sup>[15]</sup>。

有研究证实, Rab3IP 与 SXX2 结合是介导肿瘤不良生物学行为的关键环节<sup>[16]</sup>。有体外实验表明, SXX2 通过 ER $\alpha$  信号通路调节 Rab3IP 表达,使乳腺癌细胞发生上皮-间质转化,进而诱导细胞出现侵袭表型<sup>[17]</sup>。REN 等<sup>[18]</sup>发现胃癌组织和细胞 Rab3IP 表达显著上调, Rab3IP 高表达组术后 5 年总体生存率明显低于低表达组。本研究进一步分析了 Rab3IP 表达与食管癌患者生存预后的关系,结果显示, Rab3IP 表达是

影响食管癌患者总体和无瘤生存时间的独立预后危险因素, Rab3IP 高表达的食管癌患者术后总体生存时间和术后无瘤生存时间明显缩短,说明 Rab3IP 的表达可以作为食管癌患者生存预后的评价指标。

综上所述, Rab3IP 在食管癌组织表达明显上调, Rab3IP 高表达患者总体和无瘤生存时间缩短,检测 Rab3IP 表达有助于预测食管癌生存预后并指导临床治疗。但是本研究样本量偏少,且仅为单中心研究, Rab3IP 表达与食管癌患者的关系仍需要大样本证实。关于 Rab3IP 发挥的肿瘤生物学效应的具体作用机制仍需要深入研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] MILLER K D, SIEGEL R L, LIN C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289.
- [2] PAN R, ZHU M, YU C, et al. Cancer incidence and mortality: a cohort study in China, 2008-2013[J]. Int J Cancer, 2017, 141(7): 1315-1323.
- [3] 曾倩, 崔芳芳, 宇传华, 等. 中国癌症发病、死亡现状与趋势分析[J]. 中国卫生统计, 2016, 33(2): 321-323.
- [4] GUO W, CHEN Z, CHEN Z, et al. Promotion of cell proliferation through inhibition of cell autophagy signalling pathway by Rab3IP is restrained by microRNA-532-3p in gastric cancer[J]. J Cancer, 2018, 9(23): 4363-4373.
- [5] ZHANG L, MITANI Y, CAULIN C, et al. Detailed genome-wide SNP analysis of major salivary carcinomas localizes subtype-specific chromosome sites and oncogenes of potential clinical significance[J]. Am J Pathol, 2013, 182(6): 2048-2057.
- [6] DONOHOE C L, Phillips A W. Cancer of the esophagus and esophagogastric junction: an 8<sup>th</sup> edition staging primer[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(3): 282-284.
- [7] 夏晓洁, 季斌. Rab 蛋白在肿瘤发生发展中的作用[J]. 海南医学, 2017, 28(20): 3368-3371.
- [8] CETICA V, HACKMANN Y, GRIEVE S, et al. patients with griscelli syndrome and normal pigmentation identify RAB27A mutations that selectively disrupt MUNC13-4 binding[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 135(5): 1310-1318.
- [9] 关明璐, 任笑云, 王大路, 等. Rab25 蛋白在结肠癌中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(12): 1935-1937.
- [10] 宫雪, 于柳, 祝兴旺, 等. 抑制 Rab11 表达对人膀胱癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 中国医科大学学报, 2018, 47(3): 247-250.
- [11] 孙玉国, 王照岩, 杨玉玲, 等. miR-186-5p 通过靶向调控 RAB2A 在乳腺癌细胞阿霉素耐药性中的逆转作用机制[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(12): 1668-1673.

- [12] TANG X, CHEN J, WANG Y, et al. Gene cloning, expression and polyclonal antibody preparation of Rab3A for protein interaction analysis[J]. Springerplus, 2016, 5(1): 1705.
- [13] HUR K, CEJAS P, FELIU J, et al. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis[J]. Gut, 2014, 63(4): 635-646.
- [14] PFEFFER S R. Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways[J]. Mol Biol Cell, 2017, 28(6): 712-715.
- [15] VIEIRA O V. Rab3a and Rab10 are regulators of lysosome exocytosis and plasma membrane repair[J]. Small GTPases, 2018, 9(4): 349-351.
- [16] CHEN L, ZHOU W B, ZHAO Y, et al. Cancer/testis antigen SSX2 enhances invasiveness in MCF-7 cells by repressing ER $\alpha$  signaling[J]. Int J Oncol, 2012, 40(6): 1986-1994.
- [17] TONG C W, WANG J L, JIANG M S, et al. Novel genes that mediate nuclear respiratory factor 1-regulated neurite outgrowth in neuroblastoma IMR-32 cells[J]. Gene: an International Journal Focusing on Gene Cloning and Gene Structure and Function, 2013, 515(1): 62-70.
- [18] REN H, XU Z, GUO W, et al. Rab3IP interacts with SSX2 and enhances the invasiveness of gastric cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 2563-2568.

(李科 编辑)