

Gab1蛋白在肝细胞癌组织中的表达及与临床预后的关系

牛广旭¹, 李伟², 刘小慧³, 贾如江³ (1.邯郸市中心医院 病理科, 河北 邯郸 056001; 2.中国人民解放军251医院 病理科, 河北 张家口 075000; 3.邯郸市中心医院 普外科, 河北 邯郸 056001)

摘要: 目的 探讨生长因子受体相关结合蛋白1 (growth factor receptor binding protein-associated binder1, Gab1) 蛋白在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 组织中的表达及对患者临床预后的影响。方法 收集2005年1月至2014年2月邯郸市中心医院存档的70例行根治性手术的HCC患者资料, 所有患者均未进行过相关放射治疗或化学治疗。同时选取不典型增生和正常肝组织各30例为研究对象。采用免疫组织化学 (EnVision™) 法检测Gab1蛋白在上述3种组织中的表达, 并分析其与HCC临床病理因素及HCC患者4年生存率的关系。**结果** Gab1蛋白在正常肝组织、不典型增生及HCC组织中阳性表达率分别为0.00% (0/30)、33.33% (10/30) 和58.57% (41/70), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 30.78, P < 0.001$)。Gab1蛋白的阳性表达率与患者年龄、性别、组织分型及病灶形式无关 ($P > 0.05$), 但与肿瘤直径、淋巴结转移、MCM7蛋白表达及临床TNM分期有关 ($P < 0.05$)。Gab1阳性表达的HCC患者4年生存率为5.26%, 阴性表达者为25.00%, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 3.96, P = 0.04$)。**结论** Gab1蛋白的过表达参与了HCC的发生发展, 其表达水平可作为预测HCC患者4年生存预后的参考指标。

关键词: 肝细胞癌; Gab1蛋白; 增殖; 4年生存率

Expression of Gab1 protein in hepatocellular carcinoma tissue and its relationship with clinical prognosis

NIU Guang-xu¹, LI Wei², LIU Xiao-hui³, JIA Ru-jiang³ (1.Department of Pathology, the Central Hospital of Handan, Handan 056001, Hebei Province, China; 2.Department of Pathology, the 251 Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China; 3.Department of General Surgery, the Central Hospital of Handan, Handan 056001, Hebei Province, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of growth factor receptor binding protein-associated binder1 (Gab1) protein in hepatocellular carcinoma (HCC) tissue and its influence on clinical prognosis of HCC.

Methods The clinical data of 70 patients with HCC who underwent radical surgery in Central Hospital of Handan from January 2005 to February 2014 were collected, and all patients had no relevant radiotherapy or chemical treatment. Another 30 cases of atypical hyperplasia and 30 cases of normal liver tissue were also selected as the subjects. The expression of Gab1 protein in HCC tissue, atypical hyperplasia and normal liver tissues were detected by immunohistochemistry (EnVision™). The relationship between the expression of Gab1 protein and clinicopathological factors of HCC and 4-year survival rate were analyzed. **Results** The positive expression rates of Gab1 protein in normal tissue, atypical hyperplasia and HCC tissue were 0.00% (0/30), 33.33% (10/30) and 58.57% (41/70), respectively. The difference was statistically significant ($\chi^2 = 30.78, P < 0.001$). The positive expression of Gab1 protein in HCC tissue had no relationship with age, gender, histological type and lesion formation ($P > 0.05$), but was related to tumor diameter, lymphaden metastasis, MCM7 protein expression and clinical TNM stage ($P < 0.05$). The 4-year survival rate of HCC patients with positive expression of Gab1 protein was 5.26% and 25.00% in negative expression patients. The difference was statistically significant ($\chi^2 = 3.96, P < 0.05$). **Conclusions** The overexpression of Gab1 protein is involved in the development of HCC, and its expression level can be used as a prognostic indicator for predicting the 4-year survival of patients.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Gab1 protein; Proliferation; Four-year survival prognosis

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的原发性肝脏恶性肿瘤, 其发病率男性普遍高于女性。世界卫生组织数据显示, HCC 是全球第5大常见肿瘤, 第2大癌症致死病因^[1]。HCC 发生的危险因素主要为病毒感染 (HBV、HCV)、黄曲霉素B1、慢性酗酒、药物及毒素等^[2,3]。在上述因素作用下, 细胞色素P450、肿瘤蛋白P53 (tumor protein p53, TP53) 基因等发生改变, 促进肝细胞癌的形成。经网络分析, 共鉴定出331个候选肝癌标志物, 尤其是生长因子受体相关结合蛋白1 (growth factor receptor binding protein-associated binder 1, Gab1) 的k-核心度最高, 表明其在HCC相关网络中的中心定位^[4]。已有研究证实Gab1蛋白可促进细胞生长、分化及控制凋亡, 并参与多种肿瘤的发生发展^[5], 但其与HCC的相关研究尚未见报道。鉴于此, 本研究主要探讨Gab1蛋白在HCC组织中的表达并分析其与临床病理相关因素间的关系, 进一步探讨Gab1的表达对患者4年生存预后的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集整理2005年1月至2014年2月邯郸市中心医院病理科存档的70例行根治性手术的HCC患者资料, 所有患者均未进行过相关放射治疗或化学治疗。同时选取不典型增生和正常肝组织各30例。

1.2 主要试剂和方法 即用型兔抗人多克隆抗体Gab1及配套试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。采用EnVision™免疫组织化学法染色, 实验具体操作步骤按说明书进行。阳性对照由上述公司提供, 阴性对照用PBS代替一抗。

1.3 结果判断 Gab1蛋白阳性表达判断标准: 胞膜和胞浆呈棕褐色颗粒判定为阳性表达, 随机选取5个连续完整的高倍镜视野 (400×), 观察细胞染色强度及阳性细胞密度。按染色强度分级如下: 无着色计0分, 淡黄色计1分, 棕黄色计2分, 棕褐色计3分; 阳性细胞密度分级为: 阳性细胞数 ≤ 10% 计1分, 10% < 阳性细胞数 ≤ 50% 计2分, > 50% 计3分。

两者得分相乘后如 ≥ 3 分则为阳性表达^[6], 染色结果判定由2名以上副高级职称病理医师进行双盲评估。

1.4 统计学处理 数据采用SPSS 19.0统计软件处理, 计数资料以百分比表示, 采用 χ^2 检验, 多个率间的比较采用R × C χ^2 检验, 采用Kaplan-Meier法进行生存分析, 以P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 本研究纳入的70例患者中男性52例, 女性18例; 年龄37~70岁, 中位年龄48岁, < 48岁21例, ≥ 48岁49例; 肿瘤直径3~11 cm, 中位直径6 cm, 直径 < 6 cm 23例, ≥ 6 cm 47例; HCC组织高分化19例, 中分化33例, 低分化18例; 病灶形式: 多发病灶12例, 单发病灶58例; 微小染色体维持蛋白7 (minichromosome maintenance proteins 7, MCM7) 阳性51例, 阴性19例; 淋巴结转移53例, 无转移17例; TNM分期吗: I~II期52例, III~IV期18例。

2.2 Gab1蛋白在HCC组织、不典型增生和正常肝组织中的表达 免疫组织化学染色显示, Gab1蛋白着色于细胞胞质, 见图1。Gab1蛋白在正常肝组织、不典型增生组织及HCC组织中的阳性率分别为0.00% (0/30)、33.33% (10/30)、58.57% (41/70), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 30.78$, P < 0.001)。

2.3 Gab1蛋白的表达与HCC临床病理因素的关系 不同年龄、性别、癌组织分化程度及病灶形式的HCC患者其Gab1蛋白表达差异无统计学意义 (P > 0.05); 而不同肿瘤直径、是否淋巴结转移、MCM7蛋白表达及临床分期的HCC患者其Gab1蛋白表达差异有统计学意义 (P < 0.05), 见表1。

2.4 Gab1蛋白的表达与HCC患者4年生存率的关系 HCC患者随访4年, 41例Gab1阳性表达患者中3例失访, 存活2例, 存活率为5.26% (2/38); 29例Gab1阴性表达患者中1例失访, 存活7例, 存活率为25.00% (7/28), 两组存活率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 3.96$, P = 0.04), 见图2。

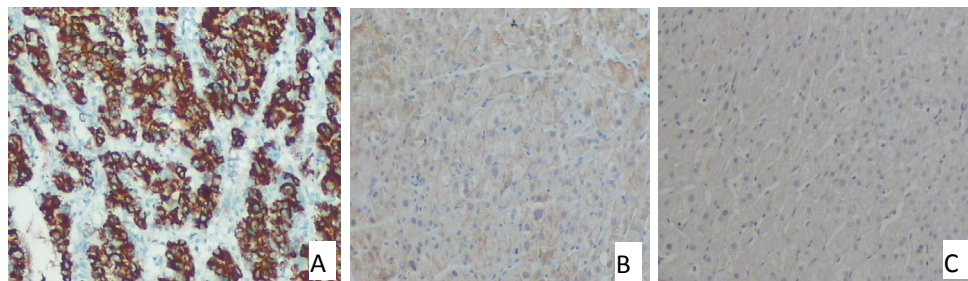


图1 Gab1在不同组织中的表达 (EnVision™ 二步法 DAB 显色, 100×)

注: A 为 HCC 组织; B 为不典型增生组织; C 为正常肝组织

表 1 70 例 HCC 患者 Gab1 蛋白的表达与 HCC 临床病理因素的关系

临床病理因素	例数	Gab1 蛋白			
		阳性 (例)	阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
年龄 (岁)					
≥ 48	49	30	61.22	0.47	0.49
< 48	21	11	52.38		
性别					
女	18	10	55.55	0.09	0.76
男	52	31	59.62		
肿瘤直径 (cm)					
≥ 6	47	32	68.09	5.34	0.02
< 6	23	9	39.13		
淋巴结转移					
有	53	35	66.04	5.01	0.03
无	17	6	35.29		
组织分化					
高分化	19	10	52.63	0.38	0.83
中分化	33	20	60.60		
低分化	18	11	61.11		
病灶形式					
多发病灶	9	5	55.55	0.04	0.84
单发病灶	61	36	59.02		
MCM7 蛋白					
阳性	51	34	66.67	5.07	0.02
阴性	19	7	36.84		
临床分期					
I ~ II 期	52	26	50.00	6.12	0.01
III ~ IV 期	18	15	83.33		

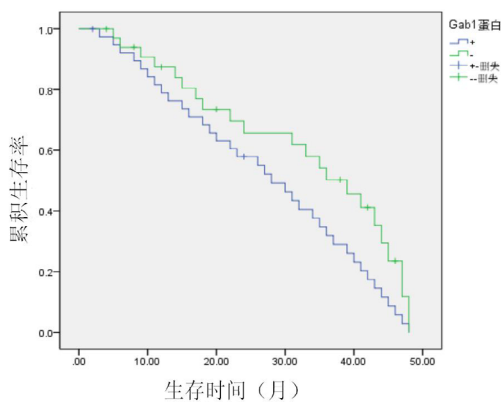


图 2 Gab1 蛋白的表达与肝细胞癌患者 4 年生存率的关系

3 讨论

HCC 发生率低于胃肠道肿瘤, 但其不良预后率高于后者。目前, HCC 的治疗方案主要为手术治疗联合放射治疗和化学治疗等综合治疗, 但放射治疗和化学治疗有时效果不明显。故寻找可增强放射治

疗和化学治疗作用的因子或蛋白质成为 HCC 的研究热点。Gab1 蛋白为高度保守的接头蛋白, 其在哺乳动物中含量最多、分布最广^[7]。Gab1 蛋白活化后可参与各种信号传导, 进而促进肿瘤的发生发展。Seiden-Long 等在结肠癌细胞系中发现, Gab1 蛋白与 Shp2 蛋白形成 Gab1-Shp2 复合物进而活化 MAPK 信号转导通路, 促进肿瘤进程, 其过度表达可刺激结肠肿瘤生长^[8]。关于 HCC 的研究表明, Shp2 类泛素化能促进 Shp2-Gab1 复合体的形成, 进而激活细胞外信号相关调节激酶, 从而加速肿瘤细胞的生长^[9]。在乳腺癌基因突变筛查中也发现了 Gab1 两体细胞 y83c 和 t387n 突变, 这直接促进了乳腺癌的进展^[10]。在头颈鳞状细胞癌、肺癌及胶质母细胞瘤等组织中, Gab1 蛋白的过表达可通过 EGFR/ErbB 信号转导通路促进细胞的增殖和肿瘤的形成^[11-13]。

本研究表明, Gab1 蛋白在 HCC 组织中的表达显著高于不典型增生和正常肝组织, 提示 Gab1 蛋白的

过表达参与了HCC的发生发展,这与Deng等^[9]研究结果一致。其机制可能是Gab1蛋白的过表达激活丝裂原活化蛋白激酶通路(MAPK)等信号转导通路,促进细胞有丝分裂,进而实现细胞增殖及肿瘤形成。本研究还表明Gab1蛋白的过表达与肿瘤直径、淋巴结转移和MCM7蛋白表达有关。肿瘤直径往往代表肿瘤细胞的增殖能力,淋巴结转移则代表肿瘤细胞的转移、浸润能力,而Gab1蛋白的过表达与两者相关,说明Gab1蛋白参与了肿瘤细胞增殖及浸润过程,其机制可能是Gab1蛋白过表达可增强肝细胞生长因子的促有丝分裂作用,同时调节血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导的内皮细胞迁移^[14],进而形成肿瘤细胞增殖与生长提供营养的肿瘤性血管^[15-17]。Gab1蛋白的过表达不仅参与了细胞间连接的断裂及与周围组织局部的粘连^[18,19],还与肿瘤细胞伪足的形成有关^[18],这也进一步说明Gab1蛋白表达越多,肿瘤细胞的浸润、转移能力越强。

MCM7是高度保守的蛋白质,参与DNA的复制和延伸^[20],尤其在细胞周期G₁期和S期的调控作用,使其与细胞增殖及肿瘤形成关系密切^[21],且在多种恶性肿瘤组织中过表达^[22-25]。本研究中Gab1蛋白的过表达与MCM7蛋白表达有关,这提示两者参与了HCC的形成,其机制可能是Gab1蛋白直接或间接活化MCM7的表达,通过MCM7调控细胞周期进而实现细胞增殖。生存分析结果提示,Gab1蛋白阳性表达的HCC患者4年生存率低于阴性表达患者,表明Gab1蛋白异常过表达可影响患者预后。

综上所述,Gab1蛋白参与了HCC的形成,其表达水平可为临床预测肿瘤细胞的增殖、侵袭及评判患者预后提供参考。同时,Bai等研究表明,在结肠癌组织中,miR-409-3p只调节Gab1,同时还能抑制肿瘤细胞转移,这提示miR-409-3p可能通过以Gab1为靶点来实现抑制结肠癌转移^[26]。这也预示着以Gab1蛋白为潜在靶点的HCC治疗方法将成为研究热点,也是本试验的后续研究内容。

参考文献

- [1] 张宏,张浩,刘丽,等.《2018年美国肝病学会肝细胞癌治疗指南》摘译[J].临床肝胆病杂志,2018,34(4):743-748.
- [2] 来茂德.病理学高级教程[M].北京:人民军医出版社,2015:302.
- [3] Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, 等.消化系统肿瘤WHO分类(下册)[M].崔全才,孟宇宏,王鲁平,译.4版.北京,2012:426-429.
- [4] Zhang Y, Li Z, Yang M, et al. Identification of GRB2 and GAB1 coexpression as an unfavorable prognostic factor for hepatocellular carcinoma by a combination of expression profile and network analysis[J]. PLoS One,2013,8(12):e85170.

- [5] 温庆良,黄煜庆,葛明华. Gab1在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 中国肿瘤,2017,26(1):53-57.
- [6] 刘磊,赵羲和,田忠. Gab1与PD-L1在胆管癌中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学,2017,25(1):68-72.
- [7] 桑海泉,刘金刚. 接头蛋白Gab1结构、功能及与肿瘤的关系[J]. 现代肿瘤医学,2012,20(12):2664-2666.
- [8] Seiden-Long I, Navab R, Shih W, et al. Gab1 but not Grb2 mediates tumor progression in Met overexpressing colorectal cancer cells[J]. Carcinogenesis,2008,29(3):647-655.
- [9] Deng R, Zhao X, Qu Y, et al. Shp2 SUMOylation promotes ERK activation and hepatocellular carcinoma development[J]. Oncotarget,2015,6(11):9355-9369.
- [10] Ortiz-Padilla C, Gallego-Ortega D, Browne BC, et al. Functional characterization of cancer-associated Gab1 mutations[J]. Oncogene,2013,32(21):2696-2702.
- [11] Hoeben A, Martin D, Clement PM, et al. Role of GRB2-associated binder 1 in epidermal growth factor receptor-induced signaling in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer,2013,132(5):1042-1050.
- [12] Fan YX, Wong L, Marino MP, et al. Acquired substrate preference for GAB1 protein bestows transforming activity to ERBB2 kinase lung cancer mutants[J]. J Biol Chem,2013,288(23):16895-16904.
- [13] Kapoor GS, Zhan Y, Johnson GR, et al. Distinct domains in the SHP-2 phosphatase differentially regulate epidermal growth factor receptor/NF-kappaB activation through Gab1 in glioblastoma cells[J]. Mol Cell Biol,2004,24(2):823-836.
- [14] Shioyama W, Nakaoka Y, Higuchi K, et al. Docking protein Gab1 is an essential component of postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-met signaling[J]. CircRes,2011,108(6):664-675.
- [15] Eroglu A, Ersöz C, Karasoy D, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, VEGF-D, VEGFR-3 and D2-40 expressions in primary breast cancer: Association with lymph node metastasis[J]. Adv Clin Exp Med,2017,26(2):245-249.
- [16] Naikoon A, Afroz D, Rasool R, et al. SNP and haplotype analysis of vascular endothelial growth factor(VEGF)gene in lung cancer patients of kashmir[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2017,18(7):1799-1804.
- [17] 吴黎明,陈先祥,程彩涛,等. CD133和VEGF在肝细胞癌表达及其预后预测价值[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2013,5(1):37-41.
- [18] Paliouras GN, Naujokas MA, Park M. Pak4, a novel Gab1 binding partner, modulates cell migration and invasion by the Met receptor[J]. Mol Cell Biol,2009,29(11):3018-3032.
- [19] Watanabe T, Tsuda M, Makino Y, et al. Crk adaptor protein-induced phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration[J]. Cell Res,2009,19(5):638-650.
- [20] Rajadurai CV, Havrylov S, Zaoui K, et al. Met receptor tyrosine kinase signals through a cortactin-Gab1 scaffold complex, to mediate invadopodia[J]. J Cell Sci,2012,125(Pt 12):2940-2953.
- [21] Xue WC, Khoo US, Ngan HY, et al. Minichromosome maintenance protein 7 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with Ki67, PCNA and clinicopathological parameters[J]. Histopathology,2003,43(5):485-490.
- [22] 牛广旭,吴士茜,谭诚,等. ANXA2与MCM7检测在结节性肝硬化和肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 医学综述,2016,22(18):3686-3689.
- [23] 任占平,石磊,戴文斌,等. HPV16/18DNA和p53、RB、MCM7蛋

- 白在乳腺癌中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(11):2606-3689.
- [24] 李琰, 张娟. MCM7、CDK2及Ki-67蛋白在甲状腺癌中表达的临床意义[J]. 实用癌症杂志,2015,30(3):359-361.
- [25] 李瑶, 刘丽娜, 杨永秀. MCM7、Ki67在宫颈鳞状细胞癌及其癌前病变中的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健,2014,29(13):2085-2088.
- [26] Bai R, Weng C, Dong H, et al. MicroRNA-409-3p suppresses colorectal cancer invasion and metastasis partly by targeting GAB1 expression[J]. Int J Cancer,2015,137(10):2310-2322.

收稿日期: 2018-09-03

牛广旭, 李伟, 刘小慧, 等. Gab1蛋白在肝细胞癌组织中的表达及与临床预后的关系[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2019,11(2):25-29.

· 消息 ·

《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》征稿启事

本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)收录,且拥有国家新闻出版广电总局等多种网上查询路径。

本刊特色栏目:

- (1) 继续教育园地(视频);
- (2) 临床病例荟萃(病例分析、典型图像分析、专家点评)。

本刊的办刊宗旨是:

贯彻党和国家的卫生工作方针政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的办刊方针,反映我国感染病临床和科研工作的重大进展,促进国内外感染病学学术交流。

欢迎登陆本刊采编系统,网址为: <http://zhshylcgr.j-ditan.com/>,欢迎您点击和投稿。您只需简单登陆,即可免费下载期刊的PDF版文章。

本刊为双月刊,每期定价28元,全年定价168元。编辑部常年办理邮购,邮发代号:80-729,欢迎订阅。

通讯地址:北京市朝阳区京顺东街8号《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》编辑部

邮编:100015

电话:010-84322058

传真:010-84322059