

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.21.015

## Gab2 在卵巢癌中的表达及其与铂类药物化疗耐药的相关性研究

冯敏,邢人鑫<sup>△</sup>,邢薇,苟元彬,李光志

(四川省医学科学院/四川省人民医院城东病区妇产科,成都 610101)

**[摘要]** **目的** 通过检测 Gab2 在卵巢癌中的表达,探讨其与卵巢癌铂类化疗耐药的相关性。**方法** 利用免疫组织化学及蛋白质印迹法(Western blotting)对该院妇产科 2011 年 1 月至 2015 年 6 月手术切除的 107 例患者浆液性卵巢癌组织、12 例膀胱癌根治术中切除正常卵巢组织中 Gab2 的表达进行检测,分析 Gab2 表达与临床分期,以及与以铂类药物为基础的联合化疗疗效的相关性。**结果** 卵巢癌组织中 Gab2 表达水平明显高于正常卵巢组织,且与肿瘤的国际妇产科联盟(FIGO)临床分期有关,分期越晚表达越高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );61 例卵巢癌患者化疗敏感,46 例发生耐药,化疗耐药患者 Gab2 表达水平明显高于化疗敏感者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** Gab2 可能成为预测铂类药物化疗敏感性的有效指标之一。

**[关键词]** 卵巢肿瘤;Gab2;顺铂;耐药**[中图分类号]** R737.31**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)21-2931-03

## Correlation between Gab2 expression in ovarian cancer and resistance to platinum drugs chemotherapy

Feng Min, Xin Renxin<sup>△</sup>, Xin Wei, Gou Yuanbin, Li Guangzhi

(Department of Gynaecology and Obstetrics, Chengdong Branch, Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610101, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the correlation between Gab2 expression and platinum drugs chemotherapy resistance by detecting the expression of Gab2 in ovarian cancer. **Methods** Immunohistochemical and Western blotting techniques were used to detect the expression of Gab2 in 107 specimens of serous ovarian tumor tissue and 12 specimens of normal ovarian tissues resected during bladder cancer radical operation in the department of gynaecology of our hospital from January 2011 to June 2015. The correlation between Gab2 expression with clinical stage and effect of combined chemotherapy based on platinum drugs was analyzed. **Results** The Gab2 expression level in ovarian cancer tissue was significantly higher than that in normal ovarian tissue, moreover had a relation with the FIGO clinical stage, the expression level of Gab2 increased with the increase of clinical stage, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ); 61 cases were sensitive to chemotherapy, 46 cases were resistant to chemotherapy, the Gab2 expression level in the patients with chemotherapy resistance was significantly higher than that in the patients with chemotherapy sensitivity, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Gab2 may become one of effective indexes for predicting platinum drugs chemotherapy sensitivity.

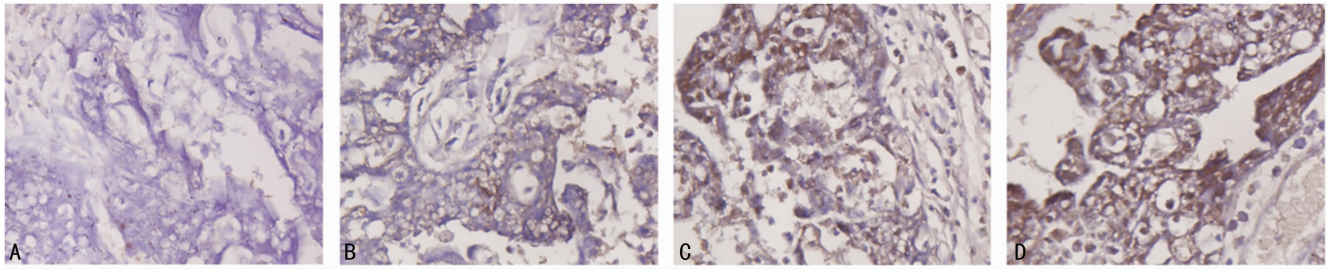
**[Key words]** ovarian neoplasms; Gab2; cisplatin; drug resistance

卵巢癌致死率在妇科恶性肿瘤中高居首位,全球每年死于卵巢癌的患者约 14 万例<sup>[1]</sup>。卵巢癌极高致死率的重要原因之一是其早期诊断困难,确诊时多为晚期,难以彻底手术清除癌灶。以铂类药物为基础的联合化疗是晚期卵巢癌的一线治疗方式,但多数患者在化疗过程中产生耐药,肿瘤复发并出现恶性进展,导致临床预后不良<sup>[2]</sup>。因此,通过对卵巢癌耐药相关因素的分析,探索参与肿瘤耐药发生的分子,为临床化疗药物的选择提供参考,是当前亟待研究的重要课题。磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt)信号通路是体内重要的细胞生存通路,主要发挥促进细胞增殖和抗细胞凋亡作用。在恶性肿瘤中,PI3K/Akt 信号通路活性显著增高,在肿瘤发生、增殖、侵袭、转移及放疗抵抗等生物学行为中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。顺铂等化疗药物的重要作用机制之一即通过抑制 PI3K/Akt 活性,抑制肿瘤生长、侵袭等。对卵巢癌的大量研究证实,PI3K/Akt 信号通路异常活化与卵巢癌化疗耐药密切相关<sup>[4]</sup>。Grb2 相关结合蛋白 2(Grb2-associated binding protein 2, Gab2)作为细胞信号通路中一种重要的连接蛋白,通过调节

PI3K/Akt 等信号通路,在肿瘤生长、分化、迁移和凋亡中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。在卵巢癌中 Gab2 表达是否与铂类药物化疗耐药相关目前尚不清楚。本研究通过检测卵巢癌组织中 Gab2 的表达,结合患者化疗效果,比较分析 Gab2 蛋白与化疗耐药的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 标本来自本院妇产科 2011 年 1 月至 2015 年 6 月手术切除的卵巢组织。其中经术后病理证实为浆液性卵巢癌的患者共 107 例,年龄 31~77 岁,平均(51.5±11.3)岁;国际妇产科联盟(FIGO)临床分期:Ⅰ~Ⅱb 期 22 例,Ⅲa~Ⅲc 期 58 例,Ⅳ期 27 例。术后患者接受紫杉醇+顺铂(TP)方案化疗 6~8 个周期,并进行随访观察及疗效评价。铂类化疗敏感和铂类化疗耐药分组标准参照美国妇科肿瘤学组(GOG)分型:化疗敏感为无病间隔至少超过 6 个月者;耐药为无病间隔小于 6 个月者<sup>[7]</sup>。另取本院膀胱癌根治术中切除的 12 例患者卵巢组织,术后病理证实为正常标本作为对照组。临床标本获取在患者知情同意并经院医学伦理委员会批准下进行。标本分



A: 正常卵巢组织; B: I ~ II b 期卵巢癌; C: III a ~ III c 期卵巢癌; D: IV 期卵巢癌

图 1 免疫组织化学检测 Gab2 在正常及浆液性卵巢癌组织内的表达 ( $\times 200$ )

别以甲醛固定后常规石蜡包埋存档及液氮冻存。

**1.2 主要试剂** 一抗为兔抗人 Gab2 多克隆抗体购自美国 Epitomics 公司, 兔抗人  $\beta$ -actin 多克隆抗体、山羊抗兔 IgG-HRP 二抗均购自美国 Thermo 公司。免疫组织化学试剂盒 [链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接 (SP) 法]、二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒、苏木精均购自北京中杉金桥生物技术公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 免疫组织化学** 检测组织内 Gab2 表达, 免疫组织化学步骤按照试剂盒说明书操作。一抗工作浓度 1:200, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为阴性对照。二甲基联苯胺 (DAB) 显色剂显色后, 苏木精复染, 中性树脂胶封片, 显微镜下观察结果。结果判定采用 Fromowitz 综合计分法, 染色强度评分: 染色呈淡黄色颗粒, 染色明显高于背景, 染色呈浅棕黄色颗粒, 以及出现大量深棕黄色颗粒分别评为 0、1、2、3 分; 阳性细胞数评分: 每片观察 10 个高倍视野, 染色阳性细胞数/100 小于 5%、5%~<26%、26%~<51%、51%~75% 或大于 75% 分别评为 0、1、2、3、4 分。染色强度评分与阳性细胞数评分之和小于 2 分判为阴性(-), 2~3 分判为弱阳性(1+), 4~5 分判为中度阳性(2+), 6~7 分判为强阳性(3+)。

**1.3.2 蛋白质印迹法 (Western blotting)** 检测组织内 Gab2 蛋白表达, 于 200 mg 组织标本加入 1 mL 裂解液, 匀浆提取总蛋白, 二喹啉甲酸 (BCA) 法测定蛋白水平后  $-70^{\circ}\text{C}$  保存备用。取 20  $\mu\text{g}$  总蛋白十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶上样, 蛋白电泳分离后转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 1:200 稀释的 Gab2 及 1:500 稀释的  $\beta$ -actin 一抗孵育,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜, Tris 缓冲生理盐水吐温 (TBST) 洗膜后置于二抗 (1:1000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜后 DAB 显色成像。目的条带与相应的  $\beta$ -actin 条带灰度值比值代表 Gab2 相对表达水平。

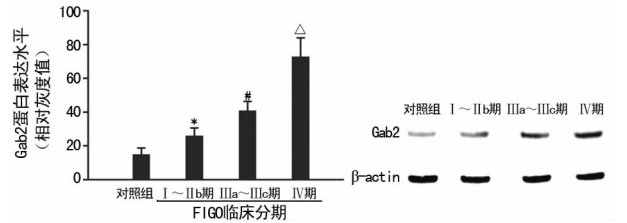
**1.4 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用单因素方差分析及独立样本  $t$  检验; 计数资料以例数或百分率表示, 比较采用  $\chi^2$  检验和 Fisher 确切概率法; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Gab2 表达与卵巢癌病理分期的关系** Gab2 主要表达于细胞质, 在细胞核少量表达, 正常卵巢组织内表达呈弱阳性或阴性, 肿瘤组织内表达明显升高, 见图 1。Gab2 表达水平与肿瘤的 FIGO 临床分期有关, 分期越晚表达越高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

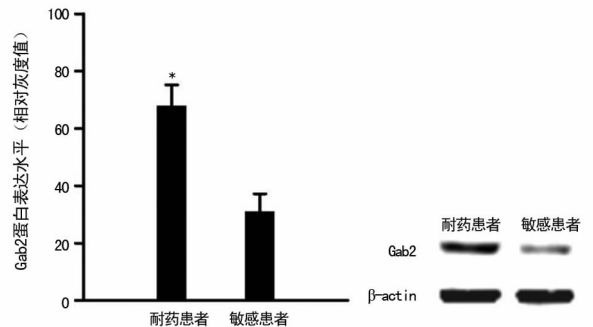
**2.2 Gab2 表达与卵巢癌化疗疗效的关系** 107 例卵巢癌患者接受 TP 方案化疗, 疗效评价结果: 61 例化疗敏感, 取得临床

缓解, 46 例发生耐药。化疗耐药患者 Gab2 表达水平高于化疗敏感患者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。



\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 I ~ II b 期卵巢癌比较;  $\Delta$ :  $P < 0.05$ , 与 III a ~ III c 期卵巢癌比较

图 2 Western blotting 检测 Gab2 蛋白在正常及浆液性卵巢癌组织内的表达



\*:  $P < 0.05$ , 与敏感患者比较

图 3 Western blotting 检测 Gab2 蛋白在 TP 化疗敏感组与耐药组的表达情况

## 3 讨论

以铂类药物为基础的联合化疗是治疗卵巢癌, 尤其是晚期卵巢癌的重要手段, 而肿瘤细胞对化疗产生耐药, 严重影响了卵巢癌患者的远期疗效和总体生存率。15%~25% 的卵巢癌患者对以铂类为基础的联合化疗方案原发耐药, 而 80% 以上患者发生继发性铂类耐药。化疗耐药是导致卵巢癌患者 5 年生存率低 (20%~30%) 的主要因素<sup>[7]</sup>。化疗耐药的相关机制尚不清楚, 目前认为它是多因素、多水平、多基因参与的复杂过程, 其中涉及药代动力学、药物作用靶点、DNA 损伤修复系统、细胞凋亡调控、肿瘤微环境、细胞外信号转导通路、微 RNA、肿瘤干细胞及上皮间质转化等<sup>[8-9]</sup>。

Gab2 是 Gabs 家族蛋白中一种至关重要的信号中介分子, 该家族蛋白通过接受多种生长因子、细胞因子及抗原等细胞外刺激, 参与信号转导的放大及整合。Gab2 蛋白被蛋白酪氨酸激酶磷酸化激活后, 招募富含 SH2 结构域的信号效应蛋白如 SHP2、PI3K 的 p85 亚基、Crk 和 GC-GAP, 进而参与多种信号转导途径, 如 PI3K/AKT、SHP2/细胞外信号调节激酶 (ERK)

及 Janus 激酶/信号转导和转录激活子(JAK/STAT)等,在肿瘤细胞增殖、分化、凋亡及迁移等生理过程中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。Wang 等<sup>[10]</sup>发现在卵巢癌细胞内 Gab2 的 mRNA 及蛋白过表达。通过激活 PI3K/Zeb1 通路,过表达的 Gab2 蛋白正向调控 E-cadherin 的表达,进而增强卵巢癌细胞的迁移和侵袭能力。相反,沉默 Gab2 将反向调节 E-cadherin 的表达,从而抑制卵巢癌细胞的迁移及侵袭能力。Dunn 等<sup>[11]</sup>也认为,Gab2 可以作为卵巢癌的一种致癌基因活化 PI3K 信号途径,在诱导卵巢癌细胞转变中发挥重要作用。最新研究发现,Gab2 可作为结肠癌及神经胶质瘤患者独立的预后指标。在结肠癌患者中,Gab2 过表达与肿瘤预后不良密切相关<sup>[12]</sup>。而在神经胶质瘤,Gab2 表达水平与患者生存期呈负相关<sup>[13]</sup>。Davis 等<sup>[14]</sup>也报道,在高度恶性浆液性卵巢癌患者中,肿瘤组织内 Gab2 表达与 PI3K/mTOR 抑制剂 PF-04691502 靶向治疗的敏感性密切相关。然而,目前尚不清楚 Gab2 分子与卵巢癌患者铂类药物化疗耐药是否相关。

本研究通过检测 Gab2 蛋白在不同分期的卵巢癌组织中的表达情况,并跟踪随访研究对象规范化疗后的耐药状况,探讨 Gab2 与化疗耐药的关系。结果显示,Gab2 蛋白表达与卵巢癌化疗效果关系密切,在耐药组患者的肿瘤组织内,Gab2 表达明显增强。由此认为,Gab2 可以作为预测卵巢癌化疗疗效的有用指标,对卵巢癌临床化疗用药提供指导,以改善卵巢癌患者预后。

#### 参考文献

- [1] Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, et al. Ovarian cancer [J]. *Lancet*, 2014, 384(9951): 1376-1388.
- [2] Davis A, Tinker AV, Friedlander M. "Platinum resistant" ovarian cancer; what is it, who to treat and how to measure benefit? [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 133(3): 624-631.
- [3] Polivka J Jr, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(2): 164-175.
- [4] Mor G, Montagna MK, Alvero AB. Modulation of apoptosis to reverse chemoresistance [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 414: 1-12.
- [5] Adams SJ, Aydin IT, Celebi JT. GAB2—a scaffolding pro-

tein in cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(10): 1265-1270.

- [6] Ding CB, Yu WN, Feng JH, et al. Structure and function of Gab2 and its role in cancer (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 4007-4014.
- [7] Harter P, Hilpert F, Mahner S, et al. Systemic therapy in recurrent ovarian cancer: current treatment options and new drugs [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010, 10(1): 81-88.
- [8] Wiedemeyer WR, Beach JA, Karlan BY. Reversing platinum resistance in high-grade serous ovarian carcinoma: targeting BRCA and the homologous recombination system [J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 34.
- [9] Ali AY, Farrand L, Kim JY, et al. Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1271: 58-67.
- [10] Wang Y, Sheng Q, Spillman MA, et al. Gab2 regulates the migratory behaviors and E-cadherin expression via activation of the PI3K pathway in ovarian cancer cells [J]. *Oncogene*, 2012, 31(20): 2512-2520.
- [11] Dunn GP, Cheung HW, Agarwalla PK, et al. In vivo multiplexed interrogation of amplified genes identifies GAB2 as an ovarian cancer oncogene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(3): 1102-1107.
- [12] Ding C, Luo J, Yu W, et al. Gab2 is a novel prognostic factor for colorectal cancer patients [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2779-2786.
- [13] Liu H, Li G, Zeng W, et al. Combined detection of Gab1 and Gab2 expression predicts clinical outcome of patients with glioma [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(8): 77.
- [14] Davis SJ, Sheppard KE, Anglesio MS, et al. Enhanced GAB2 expression is associated with improved survival in high-grade serous ovarian cancer and sensitivity to PI3K inhibition [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(6): 1495-1503.

(收稿日期: 2017-02-10 修回日期: 2017-04-15)

(上接第 2930 页)

- Management of severely comminuted distal radius fractures [J]. *J Hand Surg Am*, 2015, 40(9): 1905-1914.
- [20] 于金河, 李增炎, 彭阿钦, 等. 桡骨短缩对桡腕关节影响的生物力学研究 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2005, 23(1): 103-105.
  - [21] Fujill K, Henmi T, Kanematsu Y, et al. Fractures of the distal end of radius in elderly patients: a comparative study of anatomical and functional results [J]. *J orthop surg (Hong Kong)*, 2002, 10(1): 9-15.
  - [22] 杨彬, 王金泉, 李燕敏, 等. 桡骨远端骨折后下尺桡关节对应关系的变化及临床意义 [J]. *中国骨伤*, 2007, 20(5):

317-319.

- [23] 宋海涛, 田万成, 卢全中, 等. 桡骨远端骨折治疗后腕部尺骨撞击综合征 [J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2008, 23(2): 104-106.
- [24] 何纯青, 许猛, 张群, 等. 桡背侧双锁定钢板治疗桡骨远端不稳定骨折 [J]. *中华创伤骨科杂志*, 2011, 13(3): 230-233.
- [25] 刘广东, 阚世廉. 98 例老年桡骨远端 C 型骨折内、外固定治疗效果评价 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(4): 441-443.

(收稿日期: 2017-02-23 修回日期: 2017-04-28)