

DAB2IP 在胆囊癌中的异常表达及其临床意义

周晓春, 李向农

徐州医科大学附属医院肝胆外科, 江苏 徐州 221000

摘要: **目的** 探讨残疾基因同源物 2 相互作用蛋白(DAB2IP)基因在胆囊癌组织中的表达及其与胆囊癌临床病理之间的关系。**方法** 采用回顾性分析方法,选择 2005 年 12 月至 2015 年 12 月在徐州医科大学附属医院肝胆外科住院接受胆囊切除且资料完整的患者 72 例,其中无症状胆囊胆固醇息肉 27 例患者作为对照组,胆囊癌 45 例患者作为观察组。采用免疫组织化学染色法检测两组手术切除组织中 DAB2IP 的表达情况,分析 DAB2IP 表达水平与肿瘤临床病理因素的相关性,并采用 Logistic 回归分析影响胆囊癌预后的危险因素。**结果** DAB2IP 基因在对照组正常胆囊组织和胆囊癌组织中的表达率分别为 66.67% 和 31.11%,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。单因素分析显示,DAB2IP 表达水平与癌组织的分化程度、浸润深度和有淋巴结转移存在相关(P 均 < 0.05),但与性别、年龄、肿瘤大小无关(P 均 > 0.05)。Logistic 回归分析结果显示,DAB2IP 的低表达与高中度分化($OR = 3.51$)、浸润深度 T1 + T2($OR = 1.25$)以及有淋巴结转移($OR = 5.46$)密切相关。**结论** DAB2IP 在胆囊癌组织中表达下调,可能与胆囊癌的发生和侵袭转移有关。

关键词: 残疾基因同源物 2 相互作用蛋白; 胆囊癌; 免疫组织化学; 分化; 浸润深度; 淋巴结转移

中图分类号: R 735.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)09-1162-04

Abnormal expression of DAB2IP in gallbladder carcinoma and its clinical significance

ZHOU Xiao-chun, LI Xiang-nong

Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

Corresponding author: LI Xiang-nong, E-mail: txhx168@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression of disabled homolog 2 interacting protein (DAB2IP) in gallbladder carcinoma tissue and its relationship with gallbladder carcinoma clinical pathology. **Methods** Clinical data was retrospectively analyzed in 72 patients who received cholecystectomy in Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University from December 2005 to December 2015. Twenty-seven patients with asymptomatic gallbladder cholesterol polyps as control group, and 45 patients with gallbladder carcinoma as study group. Immunohistochemistry was used to detect the expression of DAB2IP in surgical resection specimens, and the relationship between expression of DAB2IP and tumor clinical pathologic factors was analyzed. The risk factors of gallbladder carcinoma prognosis were studied by Logistic regression analysis. **Results** The expression of DAB2IP gene in control group normal gallbladder tissue and gallbladder carcinoma tissue were 66.67% and 31.11%, respectively ($P < 0.05$). One-way analysis of variance showed that the expression of DAB2IP was related to the differentiation, depth of invasion of the cancer tissue and lymphatic metastasis (all $P < 0.05$), but there was no relationship with gender, age and tumor size (all $P > 0.05$). Logistic regression analysis showed that the well and intermediate differentiation ($OR = 3.51$), depth of invasion with stage T1 and T2 ($OR = 1.25$), and with lymphatic metastasis ($OR = 5.46$), they were risk factors for the advantage prognosis of gallbladder carcinoma. **Conclusion** The down-regulation of expression of DAB2IP in gallbladder carcinoma tissue may be related to the occurrence, invasion and metastasis of gallbladder carcinoma.

Key words: Disabled homolog 2 interacting protein; Gallbladder carcinoma; Immunohistochemistry; Differentiation; Depth of invasion; Lymphatic metastasis

胆囊癌是胆道系统最常见的恶性肿瘤,手术切除是其首选治疗手段,但疗效甚差^[1]。目前公认癌基因的活化以及抑癌基因的失活或丢失是恶性肿瘤发生、发展的主要原因^[2]。残疾基因同源物 2 相互作用

蛋白(DAB2IP)是新发现的抑癌基因,可通过介导多种肿瘤相关信号通路影响细胞的增殖、存活和凋亡,例如 DAB2IP 在前列腺癌、胃肠肿瘤、乳腺癌、肺癌等多种恶性肿瘤中的表达下调,但在胆囊癌发生、发展中的作用尚不清楚^[3-5]。本研究旨在了解 DAB2IP 基因在胆囊癌组织中的表达情况,分析其与临床病理之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用回顾性分析方法,选择 2005 年 12 月至 2015 年 12 月在我科住院接受胆囊切除且资料完整的患者 72 例,其中男 41 例,女 31 例,年龄 46~71(65.13±7.95)岁。其中无症状胆囊胆固醇息肉的 27 例患者作为对照组,45 例术后病理证实为胆囊腺癌患者作为观察组。

1.2 研究方法 采用免疫组织化学染色法检测两组手术切除组织中 DAB2IP 的表达情况,分析 DAB2IP 表达水平与癌组织相关指标的相关性。免疫组化 SP 法操作按照试剂盒说明书进行。用已知阳性切片作阳性对照。兔抗人单克隆抗体购自北京博奥森公司,免疫组化试剂选用北京中杉金桥公司。

1.3 阳性细胞标准 胆囊癌细胞质呈棕褐色至深棕色颗粒为阳性细胞。阳性细胞必须符合以下标准:(1)细胞结构清晰;(2)阳性颗粒定位精准;(3)颜色明显高于背景,比较清晰。计分方法:A,按显色细胞数记分,阳性细胞数<1/3 为 1 分,阳性细胞数 1/3~2/3 为 2 分,阳性细胞数>2/3 为 3 分。B,按细胞显色深浅记分,无阳性反应细胞为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。积分数=A×B。A×B=0 判断为(-),A×B=1~2 判断为(+),A×B=3~4 判断为(++),A×B=6~9 判断为(+++)。至少随机观察 6~8 个高倍镜视野(放大倍数为×400)。

1.4 统计学方法 所有资料通过 Epidata 3.0 进行数据录入,并用 SPSS 21.0 进行统计分析。本研究资料均为计数资料,统计方法采用 χ^2 检验。多因素分

析采用 Logistic 回归分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组和对照组 DAB2IP 基因表达情况

DAB2IP 在对照组正常胆囊黏膜组织中为弥漫性强阳性表达。在观察组,癌组织中黏膜腺体细胞 DAB2IP 有低强度的表达,并且随着胆囊癌分化程度的降低,表达呈现降低趋势。见图 1。DAB2IP 蛋白在对照组胆囊组织和胆囊癌组织中的表达阳性率分别为 66.67%(18/27)和 31.11%(14/45),组间有统计学差异($P<0.05$)。见表 1。

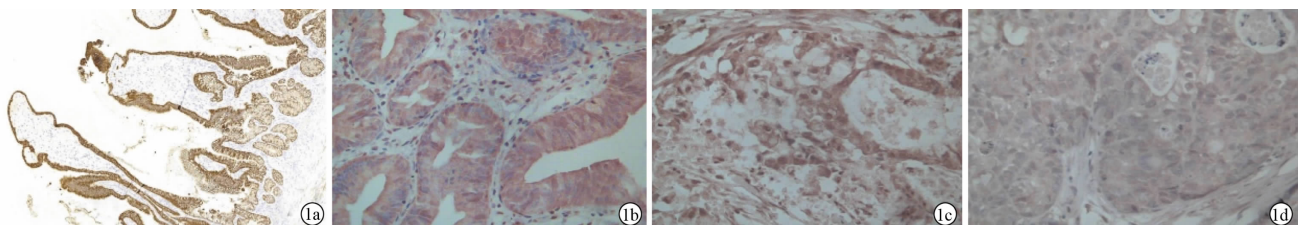
2.2 DAB2IP 表达与临床病理指标相关性分析 蛋白阳性表达率在癌不同组织学分级中为高、中度分化 50.00%,低度分化 21.74%,二者比较有统计学差异($P<0.05$);在不同浸润深度中,T1+T2 为 48.15%,T3+T4 为 11.11%,差异有统计学意义($P<0.05$);在有无淋巴结转移者中,无转移者为 52.38%,有转移者为 16.17%,差异有统计学意义($P<0.05$)。可见随着肿瘤浸润深度加深和淋巴结出现转移,DAB2IP 蛋白表达阳性率也随之下降($P<0.05$)。DAB2IP 蛋白表达率与年龄、性别及肿瘤大小无关(P 均>0.05)。见表 2。

2.3 DAB2IP 表达与胆囊癌临床病理指标的 Logistic 回归分析 以年龄、性别、肿瘤直径>3 cm、高中度分化、浸润深度 T1+T2、有淋巴结转移指标为自变量,以 DAB2IP 表达为因变量进行 Logistic 回归分析,结果显示 DAB2IP 的低表达与高中度分化($OR=3.51$)、浸润深度 T1+T2($OR=1.25$)以及有淋巴结转移($OR=5.46$)密切相关。见表 3。

表 1 观察组和对照组 DAB2IP 基因阳性率比较

组别	例数	阴性	阳性	阳性率(%)
观察组	45	31	14	31.11*
对照组	27	9	18	66.67

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。



注:1a:正常胆囊(×40);1b:正常胆囊(×400);1c:高中分化胆囊癌(×200);1d:低分化胆囊癌(×200)。

图 1 正常胆囊黏膜、胆囊癌组织 DAB2IP 蛋白表达情况的免疫组化图片

表 2 DAB2IP 表达与胆囊癌临床病理指标相关性分析

临床及病理参数	阴性(例)	阳性(例)	阳性率(%)	χ^2 值	P 值
年龄					
≤60 岁	10	5	33.33	0.216	0.642
>60 岁	22	8	26.66		
性别				0.087	0.767
男	19	14	42.42		
女	7	5	41.67		
肿瘤直径大小				0.016	0.900
≤3 cm	17	11	39.29		
>3 cm	10	7	41.18		
组织分化程度				3.919	0.047
高、中度分化	11	11	50.00		
低度分化	18	5	21.74		
浸润深度				6.667	0.010
T1、T2	14	13	48.15		
T3、T4	16	2	11.11		
淋巴结转移				5.007	0.025
无	10	11	52.38		
有	20	4	16.67		

表 3 DAB2IP 表达与胆囊癌临床病理指标的 Logistic 回归分析

变量	β	SE	Wald χ^2 值	OR	95% CI	P 值
年龄	0.52	0.61	2.91	2.15	(0.67, 5.56)	>0.05
性别	0.79	0.31	2.18	2.53	(0.74, 6.92)	>0.05
肿瘤直径 >3cm	0.39	0.37	1.37	1.07	(0.34, 3.03)	>0.05
高、中度分化	0.34	0.29	6.19	3.51	(1.72, 6.87)	<0.05
浸润深度 T1、T2	0.16	0.11	5.93	1.25	(1.13, 1.49)	<0.05
有淋巴结转移	1.62	0.75	6.05	5.46	(1.41, 18.24)	<0.05

3 讨论

现代医学证明,肿瘤是由于基因分子水平的改变,从而影响细胞的侵袭、迁移、增殖和凋亡等生物学行为^[6-8]。肿瘤的发生、发展过程中涉及多种癌基因的激活、抑癌基因的失活,甚至两者相互协同、相互作用,共同促进肿瘤的形成。随着靶向治疗技术在肿瘤领域的开展,癌基因和抑癌基因成为抗癌治疗的重要靶位点^[9]。通过对一些重要分子“靶点”的研究,使得靶向治疗成为可能。恶性肿瘤常是多种基因突变及失活累积导致,消灭恶性肿瘤细胞不能依靠单一作用一个靶位点,多种关键性靶位点联合靶向治疗是未来基因研究的一个重要趋势,基因治疗同时也将成为肿瘤治疗领域一种新的治疗手段^[10]。

DAB2IP 是一种新发现的肿瘤抑制基因。TSONG 教授实验室 1998 年第一个使用差异显示 PCR 技术发现 DOC-2/DAB2 基因。还采用酵母双杂交系统筛选方法鉴定出的 DAB2IP 蛋白作为可与 DOC-2/DAB2 的 N 末端相互作用的 RAS-GAP 家族的新成员,并克隆编码基因序列,命名为 hDAB2IP (human DOC2/DAB2 interaction protein)^[4]。随后多项研

究发现其介导多种肿瘤相关信号通路,如 RAS-RAF-MAPK 通路、PI3K/AKT 通路、NF- κ B 通路、EGFR 通路等,从而影响细胞的增殖、存活和凋亡。2010 年,有研究者探讨了前列腺癌进程中 DAB2IP 在 Ras-ERK 通路中的作用,结果显示 DAB2IP 可通过下调通路来抑制肿瘤的发展,并且与前列腺癌的进展及预后密切相关^[11-12]。其后有研究发现它在胃肠肿瘤、乳腺癌、肺癌及成神经管细胞瘤等多种恶性肿瘤的发生、发展过程中表达下调。

随着肿瘤相关细胞信号通路研究的深入,许多研究发现了与胆囊癌相关更多的细胞信号通路,包括 RAS-RAF-MAPK 通路、PI3K/AKT 通路、NF- κ B 通路、EGFR 通路、TGF- β 通路及黏蛋白信号通路、mTOR 通路等^[5,13-15]。这些信号通路在胆囊癌发生、发展中发挥着极其重要的作用。RAS-RAF-MAPK 信号通路是胆囊癌发病机制中主要信号通路之一,而 RAS-GAPs 是调节这种信号通路的重要分子。作为 Ras-GAP 家族的新成员,DAB2IP 可介导多种肿瘤相关信号通路,从而影响细胞的增殖、存活和凋亡,DAB2IP 在胆囊癌的发生及发展中起到的作用尚未证明^[16]。

本研究采用免疫组织化学染色法(SP法和SABC法)检测胆胆固醇息肉患者正常胆囊组织和胆囊癌组织中 DAB2IP 的表达情况。结果发现,正常胆囊组织 DAB2IP 的表达率为 66.67%;而胆囊癌组织为 31.11%,DAB2IP 表达与癌组织学分级、浸润深度、有无淋巴结转移密切相关。随着肿瘤浸润深度的加深和淋巴结转移的出现,DAB2IP 表达阳性率也随之下降。但 DAB2IP 表达率与肿瘤 DAB2IP 的低表达与高中度分化、浸润深度 T1 + T2 以及有淋巴结转移密切相关,表明胆囊癌患者组织中 DAB2IP 的低表达可提示肿瘤的进展。

上述结果提示,DAB2IP 作为胆囊癌相关的抑癌基因,其表达下调在胆囊癌的发生、发展、侵袭及转移中起重要作用。期望对这一研究的继续深入可为开展以 DAB2IP 为靶标的胆囊癌靶向治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 俞文隆,杨晓宇,张永杰. 胆囊癌扩大根治性切除术的范围与术式选择[J]. 中国实用外科杂志,2011,31(3):209-212.
- [2] Tseng CP, Ely BD, Li Y, et al. Regulation of rat DOC-2 gene during castration-induced rat ventral prostate degeneration and its growth inhibitory function in human prostatic carcinoma cells[J]. Endocrinology, 1998, 139(8):3542-3553.

science, 2013, 238: 11 - 18.

- [6] 徐国龙, 杨帆, 章复清, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对 PTZ 点燃型癫痫大鼠脑内氨基酸含量的影响 [J]. 中国医药学报, 2002, 17 (3): 165 - 167.
- [7] 万萍. 神经元内 Munc-18 蛋白的漏出及其在神经元表面的分布 [D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [8] 张彦平. 癫痫对海马内 Munc-18 蛋白分布和表达的影响 [D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [9] Smeyne M, Sladen P, Jiao Y, et al. HIF1 α is necessary for exercise - induced neuroprotection while HIF2 α is needed for dopaminergic neuron survival in the substantia nigra pars compacta [J]. *Neuroscience*, 2015, 295: 23 - 38.
- [10] 李炳. Munc18 蛋白的自身免疫与癫痫发作的相关研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2006.
- [11] Yang R, Puranam RS, Butler LS, et al. Autoimmunity to munc-18 in

Rasmussen's encephalitis [J]. *Neuron*, 2000, 28 (2): 375 - 383.

- [12] Santos TC, Wierda K, Broeke JH, et al. Early Golgi abnormalities and neurodegeneration upon loss of presynaptic proteins Munc18-1, Syntaxin-1, or SNAP-25 [J]. *J Neurosci*, 2017, 37 (17): 4525 - 4539.
- [13] Deshpande M, Rodal AA. Beyond the SNARE: Munc18-1 chaperones α -synuclein [J]. *J Cell Biol*, 2016, 214 (6): 641 - 643.
- [14] Chai YJ, Sierecki E, Tomatis VM, et al. Munc18-1 is a molecular chaperone for α -synuclein, controlling its self-replicating aggregation [J]. *J Cell Biol*, 2016, 214 (6): 705 - 718.
- [15] Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy [J]. *Nat Genet*, 2008, 40 (6): 782 - 788.
- [16] Böhm B, Schade B, Bauer B, et al. Tick-borne encephalitis in a naturally infected sheep [J]. *BMC Vet Res*, 2017, 13 (1): 267.

收稿日期: 2017 - 04 - 20 编辑: 周永彬

(上接第 1164 页)

- [3] Fulop V, Colitti CV, Genest D, et al. DOC-2/hDab2, a candidate tumor suppressor gene involved in the development of gestational trophoblastic diseases [J]. *Oncogene*, 1998, 17 (4): 419 - 424.
- [4] Dote H, Toyooka S, Tsukuda K, et al. Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in gastrointestinal tumour [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92 (6): 1117 - 1125.
- [5] Virmani AK, Rathi A, Zöchbauer-Müller S, et al. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92 (16): 1303 - 1307.
- [6] Chaube A, Tewari M, Garbhal RS, et al. Preliminary study of p53 and c-erbB-2 expression in gallbladder cancer in Indian patients manuscript id: 8962091628764582 [J]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 126.
- [7] Gruenberger B, Schueller J, Heubrandtner U, et al. Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11 (12): 1142 - 1148.
- [8] Lee J, Park SH, Chang HM, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13 (2): 181 - 188.
- [9] Min J, Zaslavsky A, Fedele G, et al. An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating

Ras and nuclear factor-kappaB [J]. *Nat Med*, 2010, 16 (3): 286 - 294.

- [10] 周彦明, 李玉民, 曹农, 等. 慢性胆囊炎和胆囊癌组织中 EGF、EGFR 的表达及其意义 [J]. *癌症*, 2003, 22 (3): 262 - 265.
- [11] 黄湖, 吕夕明, 黄品同, 等. 超声造影在胆囊占位性病变中的应用价值 [J]. *医学研究杂志*, 2013, 42 (1): 166 - 169.
- [12] Smits M, van Rijn S, Hulleman E, et al. EZH2-regulated DAB2IP is a medulloblastoma tumor suppressor and a positive marker for survival [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18 (15): 4048 - 4058.
- [13] 王向阳, 冯启苗, 李小兰, 等. 抑癌基因 DAB2IP 在结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. *实用医学杂志*, 2012, 28 (19): 3222 - 3224.
- [14] Xie D, Gore C, Liu J, et al. Role of DAB2IP in modulating epithelial-to-mesenchymal transition and prostate cancer metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107 (6): 2485 - 2490.
- [15] Leal P, Garcia P, Sandoval A, et al. AKT/mTOR substrate P70S6K is frequently phosphorylated in gallbladder cancer tissue and cell lines [J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6: 1373 - 1384.
- [16] Zhang X, Li N, Li X, et al. Low expression of DAB2IP contributes to malignant development and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27 (6): 1117 - 1125.

收稿日期: 2017 - 04 - 10 编辑: 王国品