

学校编码: 10384
学号: 32320130154300

分类号____密级____
UDC____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

Gab2 介导肝癌发生的机制研究

Mechanism Study on Gab2-mediated Hepatocarcinogenesis

程江红

指导教师姓名: 吕忠显教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

本人声明该学位论文不存在剽窃、抄袭等学术不端行为，并愿意承担因学术不端行为所带来的一切后果和法律责任。

声明人（签名）：

指导教师（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

肝细胞癌（HCC）是全球最常见和最致命的恶性肿瘤之一，HCC 大概占原发性肝癌的 85%-90%。据统计，全球范围内每年有一半肝癌病人(250,000/500,000)死于肝细胞癌。其主要原因可归结为没有有效的治疗方法、病人容易产生放化疗抵抗以及高度复发性。虽然目前针对诱发肝癌发生的信号机理研究发现了许多重要的治疗肝癌的靶点分子，但是临床上具有显著治疗效果，并可解决肝癌高复发难题的药物却显得捉襟见肘。因此急需找到一种能够整合细胞内多种效应分子的轴蛋白，并以此蛋白为靶点开发靶向治疗药物，从而达到改善目前治疗肝癌效率低下的目的。

Gab2 作为衔接蛋白受到细胞外刺激因子的激活，能够铆钉在细胞膜上招募细胞内的多种效应分子，介导多重信号转导，调控细胞增殖、细胞分化、细胞周期进程及细胞程序性凋亡等生物学功能。Gab2 在体内广泛表达，但是在许多肿瘤组织中表达显著高于正常对照组织，表明 Gab2 可能作为一个治疗肿瘤发展的潜在靶点。即使很多研究指出 Gab2 可以通过多重信号网络调控诸如乳腺癌、黑色素瘤、白血病和卵巢癌的发生发展，但是其在肝癌中的调节作用及调控机理还不很清楚。本文针对 Gab2 轴蛋白为靶点展开对肝癌发生信号通路的研究，逐步探究出 Gab2 在肝细胞癌发展过程中所招募的信号分子及其调控机制，为探究肝癌发生原因提供了一定的理论基础。

本文中我们探究了 Gab2 在人肿瘤组织中的表达模式，发现在肝癌组织中其表达显著高于正常粘连的癌旁组织。为了进一步确定其在原发性肝癌中的作用，我们利用野生型（WT）和 Gab2 转基因（Gab2 敲除）小鼠，执行二乙基亚硝氨（DEN）刺激诱导小鼠原发性肝癌的发生。结果证实，Gab2 敲除显著抑制了 DEN 诱导的肝细胞癌的形成。利用 CRISPR-Cas9 技术体外构建敲除 Gab2 细胞系进一步发现，Gab2 的移除明显抑制了 HepG2 细胞的增殖、迁移和在体成瘤能力。而过表达 Gab2 则显著促进了肝癌细胞的成瘤行为。为了探究 Gab2 影响肝癌发生的机制，我们执行了几种重要分子的抑制剂实验，发现 AKT, ERK 和 Jak2 抑制剂都可以反转 Gab2 过表达诱导的肝癌细胞的增殖和迁移活性。这就表明 Gab2 可以整合多种信号通路调控肝癌的发展进程。

摘要

肝脏炎症诱发肝癌发生一直是人们讨论的热点问题，本文中我们也发现 Gab2 敲除不仅抑制了 DEN 诱导的肿瘤形成，同时也改善了 DEN 诱导的肝脏炎症反应。同时，移除 Gab2 显著下调了 DEN 诱导的肝脏组织和小鼠血清中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的表达与分泌。为了进一步探寻 Gab2 介导肝脏炎症反应的证据，我们利用体外构建的过表达和敲除 Gab2 的细胞系进一步执行 WB 实验，发现过表达 Gab2 放大，而敲除 Gab2 减弱了 IL-6 诱导的肝癌细胞 Jak2/Stat3 信号通路的激活以及 Stat3 下游的靶向调控基因的表达（Bcl-2, c-Myc 和 MMP-7）。我们同样在 DEN 诱导的小鼠组织中检测了 Stat3 下游调控靶基因的表达趋势，结果证实了体外的研究结果。

因此，本文揭示 Gab2 在肝癌形成中扮演的促癌角色，证明 Gab2 通过调控 IL-6/Jak2/Stat3 信号转导影响肝癌细胞增殖和成瘤性。我们的研究为肝癌发生机制的研究提供了重要的理论支持，并为临床上肝癌的防治提供新思路。

关键词： Gab2，肝细胞癌，炎症信号

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common and deadliest malignancies worldwide. HCC accounts for 85%-90% of primary liver cancers with 500,000 new cases as well as 250,000 deaths of HCC all over the world every year. The main factors for the high mortality rate of HCC patients are due to the lack of effective treatments, the increasing resistance to conventional radiotherapy and chemotherapy, and high rate of recurrence. Though there are advanced therapeutic strategy and many target genes for HCC treatment, it is hard to overcome the difficulty of high recrudescence. Therefore, it is urgent to discover a new hub protein, that can recruit a variety of effects molecule, to ameliorate the low efficiency of HCC treatment.

Gab2 as a docking protein can recruit various intracellular downstream signal proteins to function in cell proliferation, survival, apoptosis and differentiation. It acts as a proto-oncogene, as dominantly overexpression has been detected in several types of cancer, for instance, breast cancer, melanoma, ovarian carcinoma and lung cancer. The latest study has shown that Gab2 is highly expressed in hepatocellular carcinoma and modulates the process of the development of liver cancer by ERK signaling. However, there are a number of unknown signal regulating mechanism and its function on hepatic cell growth require more exploration.

Our previous studies found that GRB2-associated-binding protein 2 (Gab2), a scaffolding/adaptor protein, governs the development of fatty liver disease. Here, we further demonstrate that Gab2 mediates hepatocellular carcinogenesis. Compared to the faint expression in para-carcinoma tissue, Gab2 was highly expressed in approximately 60~70% of human hepatocellular carcinoma (HCC) specimens. Deletion of Gab2 dramatically suppressed diethylene nitrite (DEN)-induced HCC in mice. The oncogenic effects of Gab2 in HepG2 cells were promoted by Gab2 overexpression but attenuated by Gab2 knockout. Furthermore, Gab2 knockout in HepG2 cells restrained cell proliferation, cell migration and xenograft tumour

Abstract

formation in nude mice. Signalling pathway analysis with protein kinase inhibitors showed that oncogenic regulation by Gab2 in hepatic cells involved multiple signalling pathways, including the Extracellular regulated protein kinases (ERK), Protein kinase B (AKT) and Janus kinase (Jak) pathways, especially those that mediate inflammatory signalling. Interleukin 6 (IL-6) signalling was increased by Gab2 overexpression and impaired by Gab2 deletion via the regulation of Janus kinase 2 (Jak2) and Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) phosphorylation and the expression of downstream genes, such as B-cell lymphoma 2 (*Bcl-2*), *c-Myc*, Matrix metalloproteinase-7 (*MMP7*), and *cyclin D1*, in HepG2 cells.

These data indicate that Gab2 mediates the pathological progression of HCC by integrating multiple signalling pathways and suggest that Gab2 might be a powerful therapeutic target for HCC.

Key words: Gab2, HCC, inflammatory signal

目录

目录.....	I
CONTENTS.....	V
第一章 前言	1
1.1 肝癌概述	1
1.1.1 国内外肝癌研究现状.....	1
1.1.2 诱发肝癌的因素.....	3
1.1.2.1 黄曲霉毒素与肝癌.....	3
1.1.2.2 病毒性肝炎与肝癌.....	3
1.1.2.3 肝硬化与肝癌.....	5
1.1.2.4 基因突变与肝癌.....	6
1.1.2.5 生长因子与肝癌.....	8
1.1.3 肝癌发生的机制.....	9
1.1.3.1 原癌基因及抑癌基因竞争机制.....	9
1.1.3.2 分子信号途径的异常激活.....	10
1.2 肝脏代谢紊乱与肝癌发生	11
1.2.1 肝脏代谢紊乱.....	11
1.2.2 代谢紊乱与肝癌发生的关系.....	12
1.2.3 代谢异常与肝癌的最新研究进展.....	14
1.3 Gab 家族蛋白研究动态	16
1.3.1 Gab 家族蛋白简介	16
1.3.1 Gab1 作用简介	16
1.3.2 Gab3 作用简介	17
1.3.3 Gab2 研究进展	18
1.3.3.1 Gab2 结构特征.....	18
1.3.3.2 Gab2 参与疾病调控的信号机制.....	19

1.3.3.3 Gab2 与癌症.....	21
1.3.3.3.1 Gab2 与乳腺癌.....	21
1.3.3.3.2 Gab2 与黑色素瘤.....	22
1.3.3.3.3 Gab2 与卵巢癌.....	22
1.3.3.3.4 Gab2 与白血病.....	23
1.3.3.3.5 Gab2 与其他肿瘤.....	23
1.4 本文研究意义和目的	24
第二章 材料与方法	26
2.1 实验主要溶液及配置	26
2.2 实验用主要试剂	29
2.3 实验用主要仪器	30
2.4 实验动物模型及取材	31
2.4.1 实验动物饲养.....	31
2.4.2 小鼠基因型鉴定.....	31
2.4.3 DEN 诱导原发性肝癌模型.....	32
2.4.4 异种移植模型.....	33
2.4.5 血液中细胞因子含量的测定.....	33
2.5 细胞相关实验	33
2.5.1 细胞培养及处理.....	33
2.5.2 Gab2 过表达稳转细胞系的构建.....	34
2.5.3 CRISPR-Cas9 敲除 Gab2.....	34
2.5.4 siRNA 转染实验	35
2.5.5 MTT 法检测细胞增殖	35
2.5.6 细胞迁移实验.....	35
2.6 蛋白质相关实验	36
2.6.1 肝脏蛋白的提取.....	36
2.6.2 细胞总蛋白的提取.....	36
2.6.3 蛋白浓度测定与制样.....	36
2.6.4 Western Blot.....	37

2.6.5 免疫组织化学.....	37
2.7 RNA 相关实验.....	39
2.7.1 总 RNA 的提取.....	39
2.7.2 逆转录合成 cDNA.....	39
2.7.3 实时定量 PCR.....	40
2.8 数据处理与分析.....	41
第三章 实验结果.....	41
3.1 人肝癌样本中 Gab2 呈现高表达现象.....	41
3.1.1 Gab2 在人新鲜肝癌组织中呈现高表达.....	41
3.1.2 Gab2 在肝癌芯片中呈现高表达.....	43
3.2 Gab2 敲除减弱 DEN 诱导的肝癌发生.....	44
3.2.1 DEN 诱导野生型小鼠肝脏 Gab2 表达上调.....	44
3.2.2 Gab2 敲除抑制 DEN 诱导的肝脏肿瘤发生.....	45
3.2.3 Gab2 缺失显著抑制 DEN 诱导的肿瘤形成.....	47
3.2.4 Gab2 ^{-/-} 抑制了 DEN 诱导的肝细胞的增殖.....	48
3.3 过表达 Gab2 促进肝癌细胞的增殖和迁移.....	49
3.3.1 过表达 Gab2 促进 HepG2 细胞增殖.....	49
3.3.2 过表达 Gab2 促进 HepG2 细胞迁移.....	51
3.3.3 过表达 Gab2 促进肝癌细胞肿瘤的形成.....	52
3.4 敲除 Gab2 破坏肝癌细胞的成瘤性.....	53
3.4.1 敲除 Gab2 显著抑制 HepG2 的增殖.....	53
3.4.2 敲除 Gab2 减弱 HepG2 的迁移能力.....	54
3.4.3 敲除 Gab2 抑制肝癌细胞肿瘤的形成.....	56
3.5 多重信号分子介导 Gab2 诱导的肝癌细胞的致癌行为.....	57
3.5.1 ERK, AKT 和 Jak2 参与 Gab2 诱导的肝癌细胞增殖.....	57
3.5.2 ERK, AKT 和 Jak2 参与 Gab2 诱导的肝癌细胞迁移.....	59
3.6 Gab2 介导了 DEN 诱导的炎症反应.....	61
3.7 Gab2 通过介导 IL6/Jak2/Stat3 信号通路调控肝癌发展进程.....	63
3.7.1 Gab2 参与肝癌细胞中 IL6 调控信号网络.....	63

3.7.2 Gab2 参与调控 Stat3 下游靶基因表达.....	65
3.7.3 敲除 Gab2 抑制 DEN 诱导的 Stat3 下游靶基因的表达	66
第四章 讨论	68
4.1 肝癌组织中 Gab2 表达上调	68
4.2 Gab2 ^{-/-} 抑制 DEN 诱导肝癌发生	69
4.3 Gab2 影响肝癌细胞的成瘤性	70
4.4 Gab2 调控肝癌发生信号的复杂性	71
4.5 敲除 Gab2 缓解 DEN 诱发的肝脏炎症应答	72
4.6 Gab2 介导炎症信号转导调控肝癌发生	73
4.7 SREBP-1 参与 Gab2 调控肝癌进程的可能性.....	75
4.8 Gab2 可能介导肝脏炎症诱导肝癌发生	76
4.9 结论与展望	76
参考文献	80
致谢.....	98
在学期间发表论文	99

CONTENTS

Chinese Contents	I
CONTENTS	V
Chapter I Introduction	1
1.1 HCC Overreview	1
1.1.1 Current Status of HCC	1
1.1.2 Precipitating Factors of HCC.....	3
1.1.2.1 Aflatoxin and HCC	3
1.1.2.2 Virus Hepatitis and HCC	3
1.1.2.3 Cirrhosis and HCC.....	5
1.1.2.4 Gene Mutation and HCC	6
1.1.2.5 Growth Factors and HCC.....	8
1.1.3 Mechanism of HCC	9
1.1.3.1 Competitive Mechanism of Pro-oncogene and Anti-oncogene	9
1.1.3.2 Aberrant Activation of Signaling Pathway	10
1.2 Metabolism Disorder of Liver and HCC	11
1.2.1 Hepatic Metabolism Disorder	11
1.2.2 Relationship of Metabolism Disorder and HCC.....	12
1.2.3 Current Status Between Metabolism and HCC	14
1.3 Study Trends of Gab Protein Family	16
1.3.1 Introduction of Gab Protein Family.....	16
1.3.1 Role summary of Gab1	16
1.3.2 Role summary of Gab3	17
1.3.3 Research Trends of Gab2	18
1.3.3.1 Structure Character of Gab2	18
1.3.3.2 Mechanism of Gab2-regulated Diseases.....	19

CONTENTS

1.3.3.3 Gab2 and Cancer.....	21
1.3.3.3.1 Gab2 and Breast Cancer.....	21
1.3.3.3.2 Gab2 and Melanoma.....	22
1.3.3.3.3 Gab2 and Ovarian Cancer.....	22
1.3.3.3.4 Gab2 and Leukemia.....	23
1.3.3.3.5 Gab2 and Other Types of Cancer.....	23
1.4 Research Significance and Purpose.....	24
Chapter II Materials and Methods.....	26
2.1 Experiment Solution and Configuration.....	26
2.2 Experiment Reagents.....	29
2.3 Experiment Instruments.....	30
2.4 Experimental Animal Model and Sample Collection.....	31
2.4.1 Experimental Animal.....	31
2.4.2 Genotypes Identified.....	31
2.4.3 DEN-induced Primary Liver Cancer.....	32
2.4.4 Xenograft.....	33
2.4.5 Determination of Cytokines in Blood.....	33
2.5 Cell Test.....	33
2.5.1 Cell Culture and Treatment.....	33
2.5.2 Construction of Gab2-overexpress Cell Line.....	34
2.5.3 Knockout of Gab2 by CRISPR-Cas9.....	34
2.5.4 Transfection Assay with Gab2-siRNA.....	35
2.5.5 MTT Assay.....	35
2.5.6 Migration Assay.....	35
2.6 Protein Test.....	36
2.6.1 Protein Extraction of Liver.....	36
2.6.2 Protein Extraction of Cells.....	36
2.6.3 Sample Preparation.....	36
2.6.4 Western Blot.....	37

CONTENTS

2.6.5 Immunohistochemistry	37
2.7 RNA Test	39
2.7.1 Extraction of Total RNA	39
2.7.2 Reverse Transcription	39
2.7.3 RT-PCR	40
2.8 Data processing and analysis	41
Chapter III Results	41
3.1 High Expression of Gab2 in Human HCC Samples	41
3.1.1 High Expression of Gab2 in Human Fresh HCC Samples	41
3.1.2 High Expression of Gab2 in Tissue Chip.....	43
3.2 Gab2 Ablation attenuates DEN-evoked HCC Formation	44
3.2.1 Upregulation of Gab2 in DEN-induced WT Liver	44
3.2.2 Deletion of Gab2 Inhibits DEN-evoked HCC Formation.....	45
3.2.3 Gab2 Removal Inhibits DEN-induced Tumor Formation.....	47
3.2.4 Gab2 ^{-/-} Inhibits DEN-induced Hepatic Cell Proliferation.....	48
3.3 Overexpression of Gab2 Promotes Growth and Migration of HepG2 Cell...49	
3.3.1 Upregulation of Gab2 Enhances Growth of HepG2 Cell	49
3.3.2 Upregulation of Gab2 Enhances Migration of HepG2 Cell.....	51
3.3.3 Upregulation of Gab2 Promotes Tumor Formation of HepG2 Cell	52
3.4 Deletion of Gab2 Impairs Tumor Formation Ability of HepG2 Cell	53
3.4.1 Gab2 Ablation Inhibits Growth of HepG2 Cell	53
3.4.2 Gab2 Ablation Inhibits Migration of HepG2 Cell	54
3.4.3 Gab2 Ablation Inhibits Tumor Formation of HepG2 Cell	56
3.5 Multiple Signal Molecules Involved in Gab2-evoked HCC	57
3.5.1 ERK, AKT, and Jak2 Are Involved in Gab2-induced Cell Growth	57
3.5.2 ERK, AKT, and Jak2 Are Involved in Gab2-induced Cell Migration	59
3.6 Gab2-mediated DEN-induced Inflammatory Response.....	61
3.7 Gab2 Mediates the Development of HCC by IL6/Jak2/Stat3.....	63
3.7.1 Gab2 Is Involved in IL6 Signal Pathway	63

CONTENTS

3.7.2 Gab2 Regulates Downstream Gene Expression of Stat3	65
3.7.3 Gab2 Regulates Downstream Gene Expression of Stat3 in Mice.....	66
Chapter IV Discussion	68
4.1 Gab2 Is Upregulation in HCC Samples	68
4.2 Gab2^{-/-} Inhibits DEN-evoked HCC Formation	69
4.3 Gab2 Affects tumorigenesis of HepG2 Cell	70
4.4 Signal Complexity of Gab2-evoked HCC	71
4.5 Deletion of Gab2 Relieves DEN-induced Inflammatory Response	72
4.6 Gab2 Regulates HCC Formation through Inflammation Signal	73
4.7 Possibility of SREBP-1 Involved in Gab2 Overexpression-evoked HCC	75
4.8 Gab2 Potentially Mediates Inflammation-induced Liver Cancer	76
4.9 Conclusion and Outlook.....	76
References	80
Acknowledgement.....	98
Publication	99

第一章 前言

1.1 肝癌概述

原发性肝癌（primary hepatic carcinoma）包括肝细胞型肝癌（HCC）、胆管细胞型肝癌（CC）及混合型肝癌等是一种预后较差的高侵袭性的恶性肿瘤，是全球导致男性死亡的第三大恶性肿瘤[1]。

1.1.1 国内外肝癌研究现状

根据最新的流行病学调查显示，全世界范围内肝细胞癌的发病数量大约在 74.8 万左右，而其中大概有 55% 的病人出现在中国[2]。肝癌是一种高发、死亡率高的难治性恶性肿瘤，我国肝癌的 5 年生存率不足 5%。性别和年龄是影响肝癌发病的两个重要因素。例如：肝癌发病患者中男性高于女性，但目前并不知道其中的原因。而伴随着年龄的升高，机体的代谢能力降低、细胞衰老及其他外界条件的刺激，使得正常细胞发生突变的可能性迅速增大。研究揭示，40 岁以上人群，特别是伴有肝炎病毒感染史的（5 年以上）患者为肝癌发病的高危人群。因此，肝癌严重威胁着国人的生命健康，目前肝癌的主要治疗手段是手术、介入栓塞化疗及肝移植等，但肿瘤复发转移和晚期肝癌的治疗仍是目前临床治疗中的一个短板，当下治疗肝癌的方法并不能解决高复发的难题。因此，迫切需要找到更有效的治疗手段。

肝癌常常由于病毒感染、肝脏疾病等逐步诱导而形成，潜伏期长，临床上发现时大多已到了中晚期阶段。目前对这些肝癌的主要治疗手段是手术、介入栓塞化疗及肝移植等，但复发转移甚为严重，尚缺乏有效阻止和逆转的药物。虽然癌症包括肝癌的治疗尝试了很多新的方法，如多种药物联合应用的系统化疗、分子靶向治疗、最近大热的免疫治疗等[3,4]。而其中，与其他癌症疾病一样，分子靶点的治疗仍是肝癌治疗的努力方向，但进展缓慢。截止当前，治疗晚期肝细胞癌公认的靶向药物是索拉菲尼。不过之后有关治疗肝癌的靶向药物的临床研究，都在 III 期全部失败，至今仍然没有成功的案例。索拉菲尼作为一种多重激酶抑制

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库