

## Gadd45a 和 p53 在乳腺癌中的表达及临床病理意义

高其忠<sup>1</sup>, 费伯健<sup>1</sup>, 冯一中<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>苏州大学附属第四医院普通外科, 江苏 无锡 214062; <sup>2</sup>苏州大学医学部基础医学与生物科学学院病理教研室, 江苏 苏州 215123; <sup>3</sup>苏州大学附属第二医院病理科, 江苏 苏州 215123)

**[摘要]** **目的:**探讨 Gadd45a 和 p53 在乳腺癌中的表达情况及其与临床病理参数和预后的关系。**方法:**采用免疫组化法检测 78 例乳腺癌组织及其癌旁正常组织中 Gadd45a 和 p53 的表达。**结果:**Gadd45a 在乳腺癌组织中的阳性表达率为 38.4%, 明显低于正常乳腺组织, p53 在乳腺癌组织中的阳性表达率为 65.4%, 明显高于正常乳腺组织, 差异均具有统计意义 ( $P < 0.05$ ); Gadd45a 在乳腺癌组织学 I 级组、II 级组、III 级组的阳性表达率依次下降, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); p53 在伴有淋巴结转移组中的阳性表达率高于无淋巴结转移组, 差异均有统计意义 ( $P < 0.05$ ); p53 表达与 Gadd45a 表达呈负相关 ( $P < 0.05$ ); Gadd45a 阳性组的生存期长于阴性组, 生存率高于阴性组, 存在统计学差异; p53 阳性组的生存期短于阴性组, 生存率低于阴性组, 存在统计学差异 ( $P < 0.05$ ); p53(+)Gadd45a(-)组(即阳性组)中位生存时间短于阴性组, 生存率低于阴性组。**结论:**Gadd45a 和 p53 蛋白的检测可作为乳腺癌恶性程度的检测指标; p53 的表达与乳腺癌的转移相关, Gadd45a 的表达与乳腺癌的分化分级相关; p53 高表达及 Gadd45a 低表达与乳腺癌的不良预后相关; p53(+)Gadd45a(-)表型与乳腺癌的不良预后相关; Gadd45a 蛋白有望成为乳腺癌治疗的新的靶点。

**[关键词]** Gadd45a; p53; 乳腺癌

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)02-226-05

## The expression and significance of Gadd45a and p53 in patients with breast cancer

GAO Qi-zhong<sup>1</sup>, FEI Bo-jian<sup>1</sup>, FENG Yi-zhong<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>Department of General Surgery, the 4<sup>th</sup> Affiliated Hospital of Soochow University, Wuxi 214062; <sup>2</sup>Department of Pathology, School of Biology & Basic Medical Science, Soochow University, Suzhou 215123, <sup>3</sup>Department of Surgical Pathology, the 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215123, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the expression of Gadd45a and p53 protein in breast cancer and its correlation with clinical pathologic features in breast cancer. **Methods:** The expressions of Gadd45a and p53 proteins in 78 cases of breast cancer and mammary gland tissues were determined by the immunohistochemical staining. **Results:** The expression of Gadd45a in patients was lower than that in the control mammary gland tissue, while the expression of p53 in cancer samples was higher than that in the adjacent mammary gland tissue ( $P < 0.05$ ). The positive rate of Gadd45a correlated differentiation level of cancer (Grade I, 83.3%, Grade II, 46.7%, Grade III, 16.7%,  $P < 0.05$ ), meanwhile, the positive rate of p53 in patients with lymph node metastasis was 76.6%, which was much higher than that in no metastasis patient (48.4%,  $P < 0.05$ ). p53 correlated with Gadd45a negatively. Survival analyses showed significant differences between the positive class and negative class of these three proteins [MST (median survival time): Gadd45a; 57.3m, 46.3m; p53; 47.7m, 58.6m, 5-year survival rate; Gadd45a; 89.6%, 60.0%; p53; 70.6%, 92.6%]. Survival analyses shown significant differences between the positive class and negative class of p53(+)Gadd45a(-) [MST: p53(+)Gadd45a(-); 37.5m; 58.3m, 5-year survival rate; p53(+)Gadd45a(-); 50.0%, 89.2%]. **Conclusion:** Gadd45a and p53 testing could predict the invasive behavior of breast cancer. The expression of Gadd45a correlates with a favorable prognosis, and the expression of p53 correlates with unfavorable prognosis, p53(+)Gadd45a(-) predict poor prognosis. Gadd45a and p53 could be developed to be a new breast cancer therapeutic target.

**[Key words]** Gadd45a; p53; breast carcinoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 226-230]

无论是在发达国家还是在发展中国家,乳腺癌已成为威胁女性健康的第 1 位的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。乳腺癌的发病机制尚未被人类完全认识,可能与乳腺组织长期暴露于雌激素相关,雌激素诱导的细胞周期失调和基因异常造成细胞增殖失控在肿瘤的发生和发展中起着重要的作用<sup>[2]</sup>。目前国内外学者积极探索,从癌基因、抑癌基因及基因组的稳定性等方面研究乳腺癌的发生、发展。本研究采用免疫组化法联合检测 Gadd45a 和 p53 在乳腺癌中的表达情况,并结合临床病理资料,分析其在乳腺癌中的表达及意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样本来源

收集苏州大学附属第四医院 2001 年 6 月~2006 年 6 月手术的乳腺非特殊型浸润型导管癌标本 78 例及癌旁相对正常乳腺组织(距癌组织 5 cm 以上),且临床及随访资料齐全,所有患者随访至 2010 年 6 月。所有病例术前未接受化学治疗及放射治疗。患者年龄 25~76 岁,中位年龄 37 岁。按照 2006 年版 WHO 分类进行组织学分级:Ⅰ级 12 例,Ⅱ级 30 例,Ⅲ级 36 例。临床分期:Ⅰ期 11 例,Ⅱ期 22 例,Ⅲ期 30 例,Ⅳ期 15 例。腋窝淋巴结转移 47 例。52 例肿瘤最大直径 > 2 cm。胸壁复发 6 例,远处转移 7 例。标本均经 4% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片,常规 HE 染色,病理诊断证实。

#### 1.1.2 试剂

兔抗人 Gadd45a 多克隆抗体(C-20)购自美国 Santa Cruz 公司。鼠抗人 p53 多克隆抗体购自丹麦 Dako 公司。即用型超敏 S-P 试剂盒、DAB 显色试剂盒均为福州迈新生物技术开发有限公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组化染色

采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP 法)检测 p53 和 Gadd45a 蛋白的表达。用购买试剂公司所提供的已知 p53 和 Gadd45a 阳性的切片作为阳性对照,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

#### 1.2.2 结果判定

Gadd45a 阳性结果判定:> 50% 的肿瘤细胞核和(或)细胞质内棕褐色颗粒着色者为 Gadd45a 蛋白阳性表达;p53 阳性结果判定:> 20% 的肿瘤细胞核内棕褐色颗粒着色者为 p53 蛋白阳性表达。

### 1.3 统计学方法

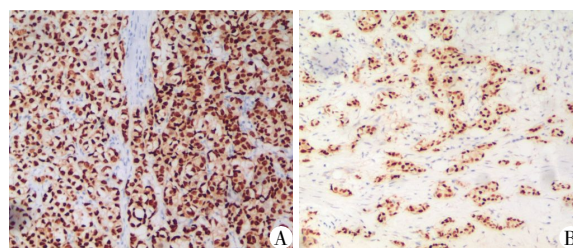
运用 SPSS13.0 统计软件,采用  $\chi^2$  检验,各蛋白与肿瘤组织学分级的关系采用趋势性  $\chi^2$  检验、Fisher 确切概率法计算 *P* 值,指标间的相关性采用列联系数分析,生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 法分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Gadd45a 和 p53 的表达

Gadd45a 在 78 例乳腺癌组织的阳性表达率为 38.4% (30/78),在正常乳腺组织阳性表达率为 67.5% (53/78)。乳腺癌组织 Gadd45a 的阳性表达率明显低于正常乳腺组织,差异有统计学意义 (*P* < 0.05,图 1A)。

p53 在 78 例乳腺癌组织的阳性表达率为 65.4% (51/78),在正常乳腺组织表达均为阴性。乳腺癌组织 p53 的阳性表达率明显高于正常乳腺组织,差异有统计学意义 (*P* < 0.05,图 1B)。



A:Gadd45a 定位于胞核;B:p53 定位于胞核。

图 1 Gadd45a 和 p53 在乳腺癌中的表达(SP 法,× 100)

Figure 1 Expression of Gadd45a and p53 in breast cancer (SP,× 100)

### 2.2 Gadd45a 和 p53 与乳腺癌临床病理参数间的关系

Gadd45a 在乳腺癌组织学Ⅰ级组、Ⅱ级组、Ⅲ级组的阳性表达率分别为 83.3% (10/12)、46.7% (14/30)、16.7% (6/36),表达依次下降,差异有统计学意义 (*P* < 0.05,表 1)。Gadd45a 的阳性表达率与肿瘤大小、临床分期、淋巴结转移、局部复发无统计学相关性 (*P* > 0.05)。

伴有淋巴结转移组 p53 的阳性表达率为 76.6% (36/47),无淋巴结转移组的阳性表达率为 48.4% (15/31),p53 在伴有淋巴结转移组的表达增高,差异有统计学意义 (*P* < 0.05,表 1)。p53 的阳性表达率与肿瘤大小、组织学分级、临床分期、局部复发无统计学相关性 (*P* > 0.05)。

### 2.3 p53 及 Gadd45a 蛋白表达相互之间的关系

p53 和 Gadd45a 表达均为阳性的标本有 13 例,

表 1 Gadd45a 和 p53 的表达与乳腺癌临床病理参数间的关系

Table 1 The correlation between the expression of Gadd45a and p53 and the clinical pathological characteristics

[n(%)]

临床病理参数	n	Gadd45a		p53	
		阳性	P 值	阳性	P 值
肿瘤大小					
≥2 cm	52	17(32.7)	> 0.05	34(65.4)	> 0.05
< 2 cm	26	13(50.0)		17(65.4)	
组织学分级					
I 级	12	10(83.3)	< 0.05	7(58.3)	> 0.05
II 级	30	14(46.7)		18(60.0)	
III 级	36	6(16.7)		26(72.2)	
临床分期					
I/II 期	33	12(36.4)	> 0.05	22(66.7)	> 0.05
III/IV 期	45	18(40.0)		29(64.4)	
腋窝淋巴结转移					
有	47	14(29.8)	< 0.05	36(76.6)	< 0.05
无	31	16(51.6)		15(48.4)	
局部复发(胸壁)					
有	6	2(33.3)	> 0.05	4(66.7)	> 0.05
无	72	28(38.9)		47(65.3)	
远处转移					
有	7	4(57.1)	> 0.05	5(71.4)	> 0.05
无	71	26(36.6)		46(64.8)	

均为阴性者有 10 例, 列联系数分析结果提示 p53 表达与 Gadd45a 表达呈负相关 ( $r = -0.366, P = 0.001$ , 表 2)。

表 2 Gadd45a 与 p53 表达关系

Table 2 The association between Gadd45a and p53

	Gadd45a(+)	Gadd45a(-)	r 值	P 值
p53(+)	13	38	-0.366	0.001
p53(-)	17	10		

#### 2.4 Gadd45a 和 p53 与预后之间的关系

Kaplan-Meier 分析 Gadd45a 与预后的关系显示, Gadd45a 阳性组中位生存时间为 57.3 个月 (标准误: 1.3, 95%CI: 56.0~59.6), 5 年生存率为 89.6%; 而 Gadd45a 阴性组中位生存时间为 46.3 个月 (标准误 2.5, 95%CI: 41.7~51.0), 5 年生存率为 60.0%; Log-rank 分析  $\chi^2 = 6.718, P = 0.010 < 0.05$ , 表明 Gadd45a 阳性组和阴性组间生存期存在统计学差异, 即 Gadd45a 阳性组优于 Gadd45a 阴性表达组 (图 2A)。

Kaplan-Meier 分析 p53 与预后的关系显示, p53 阳性组中位生存时间为 47.7 个月 (标准误: 2.2, 95%CI: 43.6~54.2), 5 年生存率为 70.6%; 而 p53 阴性组中位生存时间为 58.6 个月 (标准误 1.2, 95%CI: 57.8~59.9), 5 年生存率为 92.6%; Log-rank 分析  $\chi^2 =$

7.724,  $P = 0.049 < 0.05$ , 表明 p53 阳性组和阴性组间生存期存在统计学差异, 即 p53 阴性组优于 p53 阳性表达组 (图 2B)。

#### 2.5 p53(+)/Gadd45a(-) 与预后的关系

Kaplan-Meier 分析 Gadd45a 与患者总体生存情况的关系, 以 p53 为分层因素, p53 阴性组不具有统计学意义。而在 p53 阳性组中, Gadd45a 阳性组中位生存时间为 54.3 个月 (标准误: 1.5, 95%CI: 51.6~57.2), 5 年生存率为 86.8%, Gadd45a 阴性组中位生存时间为 37.5 个月 (标准误 3.8, 95%CI: 28.6~45.2), 5 年生存率为 50.0%, 而 Log-rank 分析  $\chi^2 = 19.545, P = 0.000 < 0.05$ , 表明在 p53 阳性组中, Gadd45a 阳性组生存情况优于阴性组 (图 2C)。

以 p53(+)/Gadd45a(-) 为一组, 即阳性组; 其余患者为另一组, 即阴性组, 应用 Kaplan-Meier 法分析 p53(+)/Gadd45a(-) 与患者总体生存情况的关系。阳性组中位生存时间为 37.5 个月 (标准误 3.8, 95%CI: 28.6~45.2), 5 年生存率为 50.0%; 而阴性组中位生存时间为 58.3 个月 (标准误: 1.7, 95%CI: 55.5~60.3), 5 年生存率为 89.2%; Log-rank 分析  $\chi^2 = 38.908, P = 0.000 < 0.05$ , 表明阳性组和阴性组间生存情况存在统计学差异, 即阴性组生存情况优于阳性组 (图 2D)。

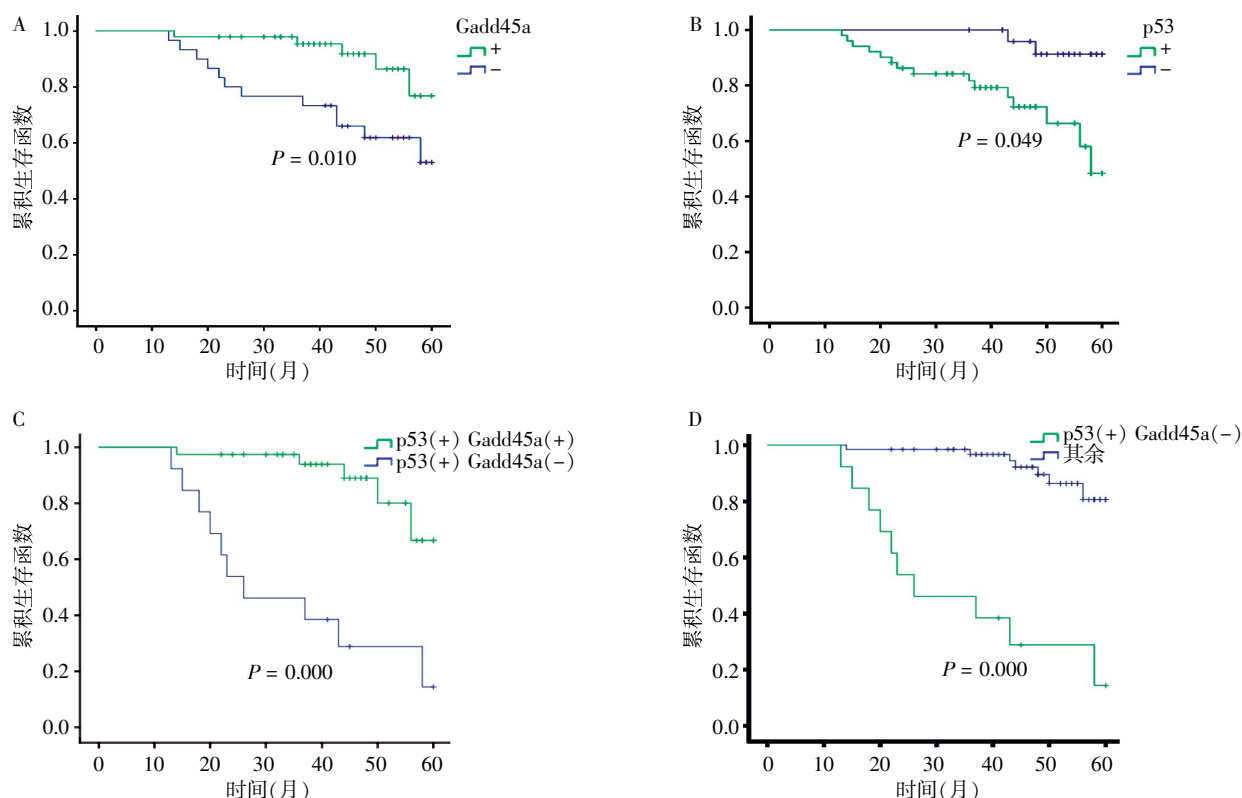


图 2 乳腺癌患者 Kaplan-Meier 生存曲线分析

Figure 2 Kaplan-Meier survival analyse of the patients with breast cancer

### 3 讨论

乳腺癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤之一,其发病机制尚未被明确认识。目前认为细胞周期失调,基因组不稳定和细胞凋亡不足可能是发病的主要机制。p53 是人类发现的最重要的抑癌基因,广泛参与了上述过程的调节,是美国临床肿瘤协会(ASCO)指南推荐的判断乳腺癌预后指标之一<sup>[3]</sup>。本研究结果发现乳腺癌肿瘤组织中的 p53 蛋白阳性率明显高于正常组织(不表达),表明在部分乳腺癌中存在 p53 基因的突变;p53 蛋白阳性率在有无淋巴结转移组中有显著性差异( $P < 0.05$ ),提示 p53 基因突变与肿瘤细胞的侵袭转移有直接关系。结合随访资料,p53 阳性组中位生存时间明显短于阴性组,生存率也明显低于阴性组,表明 p53 高表达与较差的预后和较低的生存率相关。

Gadd45a 是生长抑制 DNA 损伤基因 45(growth arrest and DNA damage-inducible, Gadd45)家族成员之一,是第一个被检出的 p53 下游靶基因<sup>[4]</sup>。Gadd45a 是维持基因组稳定性的最重要的基因之一,能够通过多种机制参与维护基因组稳定性,抑制肿瘤的发生发展<sup>[4]</sup>。Gadd45a 基因敲除小鼠较野生小鼠易于诱导产生肿瘤<sup>[5-6]</sup>;在人类胰腺癌组织

中发现 Gadd45a 存在较高频率的基因突变,并且呈高表达<sup>[7]</sup>;Higashi 等<sup>[8]</sup>应用 RT-PCR 法检测到非小细胞肺癌样本中 Gadd45a mRNA 的表达较癌旁正常组织降低,并且与肿瘤的组织病理分级显著相关,mRNA 表达越低,肿瘤细胞的恶性程度越高。Wang 等<sup>[9]</sup>在分析多种乳腺癌细胞系和原位乳腺癌肿瘤组织后发现,乳腺癌中存在高频率的 Gadd45a 基因启动子区甲基化异常。本研究结果显示,78 例乳腺癌组织 Gadd45a 的阳性表达率低于正常乳腺组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 Gadd45a 蛋白表达下调参与乳腺癌的发生和发展。本研究结果还显示 Gadd45a 蛋白表达随着肿瘤恶性度的增高而下调,提示 Gadd45a 蛋白表达异常可导致细胞周期调控失常和细胞异常增殖,促进乳腺癌的恶性演进,可作为乳腺癌分子病理诊断指标。结合随访资料,Gadd45a 阴性组中位生存时间短于阳性组,生存率低于阳性组,提示 Gadd45a 可以作为乳腺癌基因治疗的一个靶点,即提高 Gadd45a 的表达可以降低乳腺癌患者的死亡率。

在研究 Gadd45a 和 p53 关系的过程中我们发现,p53 表达与 Gadd45a 表达呈负相关( $r = -0.366$ ,  $P = 0.001$ ),提示突变了的 p53 可能下调了 Gadd45a 的表达。研究发现,p53 通过直接作用和间接作用两

种途径调节 Gadd45a 的表达<sup>[4]</sup>。野生型 p53 可直接与 Gadd45a 基因上的结合位点 p53 基序(p53 motif)结合,促进 Gadd45a 的转录表达。在 p53 结合位点上游还有个 AP-1 位点,JunD 蛋白可与 AP-1 位点结合,影响 p53 对 Gadd45a 的转录调节。正常 p53 蛋白半衰期短,用免疫组化方法测不到;而突变的 p53 蛋白半衰期延长,可用免疫组化方法测定,免疫组化法检测到肿瘤组织中的 p53 蛋白是突变型 p53 的产物<sup>[10-11]</sup>。本研究中 Gadd45a 下调可能与野生型 p53 缺失或抑制有关。由于 p53 下调了 Gadd45a 的表达,我们进一步以 p53 为分层因素,分析 Gadd45a 与预后的关系。结果发现在 p53 阳性组中,Gadd45a 可以作为独立的预后因素,即在 p53 阳性组中,Gadd45a 阳性组中位生存时间长于阴性组,生存率高于阴性组,差异具有统计意义。进一步以 p53(+)/Gadd45a(-)作为预后指标分析,p53(+)/Gadd45a(-)组中位生存时间短于阴性组,生存率高于阴性组,差异具有统计意义。p53 蛋白阳性与 p53 基因突变密切相关,而突变了 p53 蛋白不仅丧失了 p53 蛋白原有的抑癌基因功能,而且还能抑制野生型 p53 的抑癌功能,并能与多种细胞内蛋白相互作用,增加基因组的不稳定,促进肿瘤的进一步恶化,并能诱导多种蛋白的表达,影响肿瘤对化放疗敏感性<sup>[12]</sup>,进而影响患者预后。而 Gadd45a 可以通过多种机制抑制肿瘤生长,维持基因组的稳定性,因此增加细胞内 Gadd45a,可以抑制肿瘤的侵袭转移<sup>[13]</sup>。即使在 p53 阳性患者中,Gadd45a 阳性患者的总生存率也较阴性患者高,中位生存时间也较长<sup>[14]</sup>,可见 Gadd45a 对 p53 阳性患者也有保护性意义,提高肿瘤中 Gadd45a 的水平能够改善患者预后。

综上所述,本实验表明 p53 及 Gadd45a 蛋白在乳腺癌的发生、发展中起重要作用,p53 突变及 Gadd45a 蛋白异常表达可导致细胞基因组不稳定性增加,易于获得新的表型,侵袭性和转移能力增强,促进乳腺癌恶性演进。联合检测乳腺癌标本中 p53 及 Gadd45a 蛋白的表达,可为判断乳腺癌的预后提供更加准确的指标,增加其临床应用价值。而 p53 阳性组中 Gadd45a 的研究也表明 Gadd45a 可作为乳腺癌治疗的新的靶点,改善乳腺癌患者的预后。

[参考文献]

[1] Ahmedin J,Rebecca S,Jiaquan X,et al. Cancer statistics 2010[J]. CA Cancer J Clin,2010,60(5):277-300  
 [2] Elizabeth AM,Robert LS. Biological determinants of en-

doctrine resistance in breast cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2009,9(9):631-643  
 [3] Lyndsay H,Herbert F,Robert M,et al. American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer[J]. J Clin Oncol,2007,25(33):5287-5312  
 [4] 姬峻芳,吴昊,詹启敏. Gadd45a 在抑制细胞转化和肿瘤恶性进展中的作用 [J]. 生物化学与生物物理进展,2006,33(12):1146-1154  
 [5] Hollander MC,Sheikh MS,Bulavin DV,et al. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice[J]. Nat Genet,1999,23(2):176-184  
 [6] Hollander MC,Kovalsky O,Salvador JM,et al. Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency[J].Cancer Res,2001,61(6):2487-2491  
 [7] Yamasawa K,Nio Y,Dong M,et al. Clinicopathological significance of abnormalities in Gadd45 expression and its relationship to p53 in human pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res,2002,8(8):2563-2569  
 [8] Higashi H,Vallbohmer D,Wamecke-Eberz U,et al. Down-regulation of Gadd45 expression is associated with tumor differentiation in non-small cell lung cancer [J]. Anti-cancer Res,2006,26(3A):2143-2147  
 [9] Wang W,Huper G,Guo Y,et al. Analysis of methylation-sensitive transcriptome identifies GADD45a as a frequently methylated gene in breast cancer[J]. Oncogene, 2005,24(16):2705-2714  
 [10] 李大虎,张令强,贺福初. 突变体 p53 研究进展[J]. 遗传,2008,30(6):697-703  
 [11] Brambila E,Gazzeri S,Moro D,et al. Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas [J].Am J Pathol,1993,143(1):199-210  
 [12] Catherine W,Paul DP,Monica H. p53 polymorphisms: cancer implications[J]. Nat Rev Cancer,2009,9(2):95-107  
 [13] Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2 [J]. J Clin Oncol,2002,20(9):2310-2318  
 [14] Longatto-Filho A,Pinheiro C,Pereira SM,et al. Lymphatic vessel density and epithelial D2-40 immunoreactivity in pre-invasive and invasive lesions of uterine cervix[J]. Gynecol Oncol,2007,107(1):45-51

[收稿日期] 2011-06-30