

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.06.015

· 临床研究 ·

## 食管鳞癌组织中 *Gadd45G* 基因家族的表达及其临床意义

何宏涛<sup>1</sup>, 李书梅<sup>2</sup>, 郭炜<sup>1</sup>, 邝钢<sup>1</sup>, 崔蕾<sup>1</sup>, 田国<sup>2</sup>, 董稚明<sup>1</sup>(1. 河北医科大学第四医院暨河北省肿瘤研究所病理研究室, 河北 石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院 病案室, 河北 石家庄 050011)

**[摘要]** **目的:**观察生长阻滞和DNA损伤诱导基因(growth arrest and DNA-damage-inducible 45, *Gadd45*)家族在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中的表达,并探讨其临床意义。**方法:**选取河北医科大学第四医院2004-2008年间食管鳞癌患者128例的癌组织和癌旁组织标本。RT-PCR检测*Gadd45*家族*Gadd45A*、*Gadd45B*和*Gadd45G* mRNA在食管鳞癌组织及癌旁组织中的表达,免疫组织化学方法检测*Gadd45A*、*Gadd45B*和*Gadd45G*蛋白在食管鳞癌组织及癌旁组织中的表达情况,分析*Gadd45A*、*Gadd45B*和*Gadd45G*表达与食管鳞状细胞癌的临床病理特征和预后之间的关系。**结果:**与癌旁组织相比,食管鳞癌组织中*Gadd45A* mRNA表达水平显著升高[(0.8924 ± 0.3457) vs (0.6123 ± 0.2132),  $P < 0.05$ ];*Gadd45B* mRNA表达水平没有显著变化[(0.8256 ± 0.3110) vs (0.8173 ± 0.3069),  $P > 0.05$ ];*Gadd45G* mRNA表达水平显著降低[(0.3855 ± 0.1210) vs (0.8214 ± 0.3069),  $P < 0.05$ ],癌组织中*Gadd45G* mRNA表达与TNM分期和组织学分化程度密切相关。*Gadd45A*在癌旁组织中的蛋白表达以细胞核着色为主,而在部分肿瘤组织中表现为细胞质表达模式。与癌旁组织相比,食管鳞癌组织中*Gadd45A*的表达显著升高( $\chi^2 = 55.603, P = 0.000$ );*Gadd45B*的表达没有显著性差异( $\chi^2 = 0.456, P = 0.500$ );*Gadd45G*的表达显著降低( $\chi^2 = 70.134, P = 0.000$ )。Ⅲ期和Ⅳ期食管鳞癌患者*Gadd45G*蛋白表达水平显著低于Ⅰ期和Ⅱ期患者( $\chi^2 = 5.768, P = 0.016$ ),低分化组的*Gadd45G*蛋白阳性表达率显著低于中高分化组( $\chi^2 = 4.483, P = 0.034$ )。*Gadd45G*阳性患者的5年存活率明显高于阴性患者(44% vs 21%,  $P < 0.05$ );Cox模型分析显示,*Gadd45G*蛋白的表达是食管鳞癌患者的一个独立预后因素。**结论:***Gadd45A*和*Gadd45G*基因在食管鳞癌中的异常表达可能参与了食管鳞癌的发生、发展。

**[关键词]** 食管;鳞状细胞癌;*Gadd45*;表达;预后

**[中图分类号]** R735.1;R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)06-0717-08

## Expressions of growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gene family members in esophageal squamous cell carcinoma and their clinical significance

He Hongtao<sup>1</sup>, Li Shumei<sup>2</sup>, Guo Wei<sup>1</sup>, Kuang Gang<sup>1</sup>, Cui Lei<sup>1</sup>, Tian Guo<sup>2</sup>, Dong Zhiming<sup>1</sup>(1. Department of Pathology, Cancer Institute of Hebei, The Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Medical Record, Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of growth arrest and DNA-damage-inducible 45 (*Gadd45*) gene family members in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and discuss its clinical significance. **Methods:** ESCC tissues and paracancerous tissues of one hundred and twenty-eight patients with ESCC from the Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University during 2004-2008 were included in this study. The expressions of *Gadd45A*, *Gadd45B* and *Gadd45G* mRNA in the ESCC tissues and paracancerous tissues were detected by RT-PCR. The protein expressions of *Gadd45A*, *Gadd45B* and *Gadd45G* in ESCC tissues and paracancerous tissues were detected by using immunohistochemistry methods. The relation was analyzed between the expressions of *Gadd45A*, *Gadd45B* and *Gadd45G* and the clinical

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81101854)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81101854)

**[作者简介]** 何宏涛(1971-),男,河北省石家庄市人,硕士,副主任医师,主要从事恶性肿瘤的诊断与治疗。E-mail: htthe@sina.com

**[通信作者]** 董稚明(Dong Zhiming, corresponding author), E-mail: dongzhiming2000@gmail.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20131202.1522.007.html>

pathologic characteristics and prognosis of ESCC. **Results:** Compared to the paracancerous tissues, the expression of *Gadd45A* mRNA in the tumor tissues was significantly increased ( $[0.8924 \pm 0.3457]$  vs  $[0.6123 \pm 0.2132]$ ,  $P < 0.05$ ), *Gadd45B* mRNA showed no significant changes ( $[0.8256 \pm 0.3110]$  vs  $[0.8173 \pm 0.3069]$ ,  $P > 0.05$ ), *Gadd45G* mRNA was significantly decreased ( $[0.3855 \pm 0.1210]$  vs  $[0.8214 \pm 0.3069]$ ,  $P < 0.05$ ), and the expression of *Gadd45G* mRNA was closely associated with TNM stage and histological differentiation. The expression of *Gadd45A* in the paracancerous tissues was mainly stained in nucleolus, while part of the tumor tissues demonstrated a cytoplasm expression mode. Compared with the paracancerous tissues, the expression of *Gadd45A* in the tumor tissues was significantly increased ( $\chi^2 = 55.603$ ,  $P = 0.000$ ), *Gadd45B* showed no significant difference ( $\chi^2 = 0.456$ ,  $P = 0.500$ ), and *Gadd45G* was significantly decreased ( $\chi^2 = 70.134$ ,  $P = 0.000$ ). The expression of *Gadd45G* in patients in phase III and IV was significantly lower than that in patients in phase I and II ( $\chi^2 = 5.768$ ,  $P = 0.016$ ), and was significantly lower in the low differentiation group than in the high and moderate differentiation groups ( $\chi^2 = 4.483$ ,  $P = 0.034$ ). The 5-year survival rate of patients with *Gadd45G*-positive was significantly higher than that of patients with *Gadd45G*-negative (44% vs 21%,  $P < 0.05$ ); Cox model analysis shows that *Gadd45G* expression was an independent prognostic factor for ESCC. **Conclusion:** Aberrant expression of *Gadd45A* and *Gadd45G* may participate in the development and progression of ESCC. **[ Key words ]** esophagus; squamous cell carcinoma; *Gadd45*; expression; prognosis

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(6): 717-724 ]

生长阻滞和 DNA 损伤诱导基因( growth arrest and DNA-damage-inducible 45, *Gadd45*)家族是参与 DNA 损伤修复的重要相关基因, 是对细胞增殖呈负性调控的应激反应基因家族, 在细胞凋亡和细胞生存中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。该家族拥有 *Gadd45A*( 亦称作 *DDIT1*、*GADD45* )、*Gadd45B*( 亦称作 *MYD118* )和 *Gadd45G*( 亦称作 *CR6*、*DDIT2*、*Gadd45Gamma*、*GRP17* )三个成员<sup>[2]</sup>, 它们虽然定位于不同的染色体区域, 但基因序列同源性很高, 并在 DNA 损伤修复、细胞凋亡以及信号转导等方面发挥着重要的调控作用<sup>[3]</sup>, 与肿瘤发生、发展和转归的关系十分密切<sup>[4]</sup>。此基因家族的三个成员在乳腺癌<sup>[5]</sup>、肺癌<sup>[6]</sup>、肝癌<sup>[7]</sup>、前列腺癌<sup>[8]</sup>、结肠癌<sup>[9]</sup>、脑胶质瘤<sup>[10]</sup>中的作用均有报道, 但它们在食管鳞状细胞癌( esophageal squamous cell carcinoma, ESCC )中的表达及作用研究较少。本研究拟检测食管鳞癌中 *Gadd45A*、*Gadd45B* 和 *Gadd45G* 的 mRNA 及蛋白表达情况, 结合临床资料, 探讨它们的表达与食管鳞癌的浸润、转移、分化程度之间的相关性和对食管鳞癌预后评估的意义, 以期对食管鳞癌的发病机制及 *Gadd45G* 基因家族在食管鳞癌中的作用有更深入的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

TRIzol 购自 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒( reverse transcription system A3500 )购自 Promega 公司, 引物均在北京赛百胜基因技术有限公司合成, 兔抗人 *Gadd45A* 多克隆抗体( sc-792 )、兔抗人 *Gadd45B*

多克隆抗体( sc-33172 )、兔抗人 *Gadd45G* 多克隆抗体( sc-33173 )均为美国 Santa Cruz 公司产品, 即用型 SP 法免疫组织化学试剂盒购于北京中杉金桥生物技术开发有限公司。

### 1.2 研究对象和标本来源

研究对象选自河北医科大学第四医院 2004 - 2008 年间收治的食管鳞癌手术患者, 共 128 例, 其中男性 92 例, 女性 36 例, 年龄 38 ~ 77 岁, 中位年龄 59.8 岁。每例患者均取癌旁黏膜组织及食管癌原发灶组织, 全部患者术前均未经化疗和放疗。手术切除标本一部分于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存用于 RNA 的提取, 一部分以 10% 中性甲醛溶液固定, 常规制作蜡块保存, 用于免疫组织化学染色。肿瘤组织及癌旁组织均经常规病理诊断证实。按照国际抗癌联盟( International Union Against Cancer, UICC )制定的标准进行 TNM 分期, 在 128 例 ESCC 患者中, I 期 6 例( 4.7% )、II 期 63 例( 49.2% )、III 期 55 例( 43.0% )、IV 期 4 例( 3.1% )。按照世界卫生组织( World Health Organization, WHO )肿瘤的病理学分级标准, 128 例 ESCC 患者中, 31 例为高分化( 24.2% )、50 例为中等分化( 39.1% )、47 例为低分化( 36.7% )。

### 1.3 RT-PCR 方法检测 *Gadd45A*、*Gadd45B* 和 *Gadd45G* mRNA 在食管鳞癌组织中的表达

按 TRIzol 试剂说明书提取肿瘤组织和癌旁组织的总 RNA, 并参照反转录试剂盒说明书的比例加样, 将 *Gadd45A*、*Gadd45B* 和 *Gadd45G* RNA 反转录成 cDNA, 以 *GAPDH* 作为内参照, 引物及退火温度

见表1。反应条件为94℃预变性5 min后,94℃变性50 s、按照各基因退火温度退火50 s、72℃延伸60 s,共30个循环,最后72℃继续延伸10 min。PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳,采用Gel Work-

2ID软件对电泳图像中目的基因的mRNA表达水平进行半定量分析(图1)。以目的基因条带的光密度值与*GAPDH*条带的光密度值的比值作为目的基因mRNA的相对表达强度。实验重复3次,取平均值。

表1 *Gadd45A*、*Gadd45B*和*Gadd45G*的RT-PCR引物序列及反应条件

Tab.1 Primer sequences and reaction conditions of *Gadd45A*, *Gadd45B* and *Gadd45G* in RT-PCR

Gene	Primers	Annealing temperature (t/℃)	Product size (bp)
Gadd45A	F: 5'-TGAGTGAGTGCAGAAAGCAG-3'	55	181
	R: 5'-TTTGCTGAGCACTTCTCCA-3'		
Gadd45B	F: 5'-AACATGACGCTGGAAGAGCT-3'	56	247
	R: 5'-AGAAGGACTGGATGAGCGTG-3'		
Gadd45G	F: 5'-AACTAGCTGCTGTTGATCG-3'	55	178
	R: 5'-CGTTCAAGACTTTGGCTGAC-3'		
GAPDH	F: 5'-GGGAAACTGTGGCGTGAT-3'		342
	R: 5'-GTGGTCGTTGAGGGCAAT-3'		

#### 1.4 免疫组织化学法检测 *Gadd45A*、*Gadd45B*和*Gadd45G*蛋白在食管鳞癌组织中的表达

石蜡切片经常规脱蜡,用含3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的甲醇溶液封闭内源性过氧化物酶,微波修复15 min。依次加入一抗(1:100)及相应的即用型生物素化二抗和即用型辣根过氧化物酶标记的三抗,DAB显色,苏木精对比染色细胞核,常规脱水、透明、中性树胶封固。PBS取代一抗作为空白对照,其余步骤同上。用已知阳性切片作为各基因蛋白表达阳性对照。随机选取5个高倍视野(×400)计数瘤细胞总数和阳性细胞数,得出阳性细胞百分率,阳性细胞率≤25%记为0分,26%~50%为1分,51%~75%为2分,>75%为3分;再按多数阳性细胞呈现的染色强度予以记分,无显色为0分,浅棕黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。将上述2项得分相加,0分判为“-”,1~2分判为“+”,3~4分判为“++”,5~6分判为“+++”。由3名有经验的临床病理医师阅片,采用双盲评估的方法,根据其评分的平均值来确定判定结果。本研究进行结果分析时,以“++”和“+++”定义该蛋白为阳性表达,“-”和“+”定义为阴性表达。

#### 1.5 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5统计软件分析,计数资料采用 $\chi^2$ 和校正 $\chi^2$ 检验,计量资料采用*t*检验,相关性分析采用Spearman分析,采用

Kaplan-Meier法分析各基因表达与术后5年生存率的相关性,Log-rank检验其统计学差异,Cox回归分析各种预后因素的独立预后意义。双侧检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *Gadd45A*在食管鳞癌细胞核中高表达

食管鳞癌组织中*Gadd45A*mRNA表达水平显著高于癌旁组织[(0.8924 ± 0.3457) vs (0.6123 ± 0.2132), $P < 0.05$ ;图1]。Ⅲ期和Ⅳ期食管鳞癌患者癌组织中*Gadd45A*mRNA表达水平显著高于Ⅰ期和Ⅱ期患者[(0.9628 ± 0.3812) vs (0.7963 ± 0.2411), $P < 0.05$ ]。按照年龄、性别及组织分化程度分组进行统计分析,食管鳞癌中*Gadd45A*mRNA表达差异均不具有统计学意义(均 $P > 0.05$ )。

*Gadd45A*蛋白表达存在两种表达模式,一种是细胞质和细胞核均着色,细胞核占优势,称之为细胞核模式;另一种是细胞质着色明显,细胞核不着色或着色浅,称之为细胞质模式(图2)。128例癌旁组织中,99例(77.3%)表现为*Gadd45A*阳性表达,且均为细胞核表达模式。而在癌组织中,仅有66例(51.6%)表现为细胞核表达模式,50例(39.1%)表现为细胞质表达模式。食管鳞癌组织及癌旁组织中*Gadd45A*的蛋白表达有显著性差异( $\chi^2 = 55.603, P = 0.000$ )(表2)。*Gadd45A*在食管鳞癌中

的蛋白表达与患者的年龄、性别及组织分化程度无关 ( $P > 0.05$ ), 而与 TNM 分期密切相关 ( $\chi^2 = 5.583, P = 0.018$ ) (表 2)。

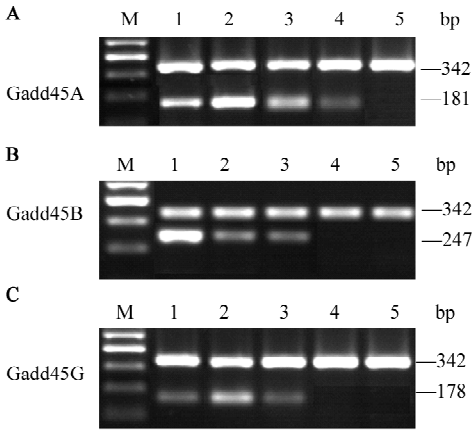


图 1 RT-PCR 检测 *Gadd45A*、*Gadd45B* 和 *Gadd45G* 的 mRNA 在食管鳞癌中的表达

Fig. 1 Expressions of *Gadd45A*, *Gadd45B* and *Gadd45G* mRNA in ESCC tissues detected by RT-PCR

M: Marker; 1, 2, 3, 4: Positive mRNA expression; 5: *GAPDH*

### 2.2 *Gadd45B* 在食管鳞癌中的表达

食管鳞癌组织中 *Gadd45B* 的 mRNA 表达水平与癌旁组织相比没有显著性差异 [ $(0.8256 \pm 0.3110)$  vs  $(0.8173 \pm 0.3069)$ ,  $P > 0.05$ ; 图 1]。按照年龄、性别、肿瘤分期及组织分化程度分组进行统计分析, 食管鳞癌中 *Gadd45B* 的 mRNA 表达均不具有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

免疫组化实验结果(图 2)显示, *Gadd45B* 主要为细胞质着色。食管鳞癌组织中 *Gadd45B* 蛋白表达阳性率为 85.2% (109/128), 与癌旁组织 (82.0%, 105/128) 相比没有显著性差异 ( $\chi^2 = 0.456, P = 0.500$ ) (表 2)。按照年龄、性别、肿瘤分期及组织分化程度分组进行统计分析, 食管鳞癌中 *Gadd45B* 的蛋白表达均不具有显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (表 2)。

### 2.3 *Gadd45G* 在食管鳞癌中的表达

食管鳞癌组织中 *Gadd45G* mRNA 表达水平显著低于癌旁组织 [ $(0.3855 \pm 0.1210)$  vs  $(0.8214 \pm 0.3069)$ ,  $P < 0.05$ ; 图 1]。III 期和 IV 期食管鳞癌患者癌组织中 *Gadd45G* 的 mRNA 表达水平显著低于 I 期和 II 期患者 [ $(0.2305 \pm 0.0984)$  vs  $(0.5234 \pm 0.1891)$ ,  $P < 0.05$ ], 低分化组食管鳞癌患者癌组织中 *Gadd45G* mRNA 表达水平显著低于中高分化组 [ $(0.2410 \pm 0.0991)$  vs  $(0.5313 \pm 0.1921)$ ,  $P <$

$0.05$ ]。按照年龄、性别分组进行统计分析, 食管鳞癌中 *Gadd45B* mRNA 表达均不具有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

*Gadd45G* 蛋白主要为细胞质着色。食管鳞癌组织中 *Gadd45G* 蛋白表达阳性率为 32.8% (42/128), 而相应癌旁组织的蛋白表达阳性率为 84.4% (108/128), 两者差异具有统计学意义 ( $\chi^2 = 70.134, P = 0.000$ ) (表 2)。*Gadd45G* 在食管鳞癌中的蛋白表达与患者的年龄性别无关。III 期和 IV 期食管鳞癌患者 *Gadd45G* 蛋白表达水平显著低于 I 期和 II 期患者 ( $\chi^2 = 5.768, P = 0.016$ ), 低分化组的 *Gadd45G* 蛋白阳性表达率显著低于中高分化组 ( $\chi^2 = 4.483, P = 0.034$ ) (表 2)。

### 2.4 食管鳞癌中 *Gadd45A* 与 *Gadd45G* 表达的相关性分析

由于 *Gadd45A* 和 *Gadd45G* 在食管鳞癌组织和癌旁组织中的表达均有明显差异, 本研究进一步对这两种蛋白在食管鳞癌组织中的表达进行了相关性分析。分析结果显示, 食管鳞癌组织中 *Gadd45A* 与 *Gadd45G* 蛋白的表达无明显的相关性 ( $r = 0.134, P = 0.306$ ) (表 3)。

### 2.5 *Gadd45A*、*Gadd45B* 和 *Gadd45G* 的表达与食管鳞癌预后的关系

128 例食管鳞癌患者均进行术后随访, 全部病例 5 年生存率为 28.9%, 其中 16 例病例因各种原因而导致失访。*Gadd45A* 和 *Gadd45B* 蛋白的表达对食管鳞癌患者的 5 年生存率没有显著影响, 而 *Gadd45G* 表达阳性患者的 5 年生存率 (44.0%) 显著高于 *Gadd45G* 表达阴性患者的 5 年生存率 (21.0%) ( $P < 0.05$ , Log-rank 检验; 表 4)。III、IV 期食管鳞癌患者同时伴随 *Gadd45G* 阴性表达者, 预后较差 (图 3)。运用 Cox 模型分析 (表 5) 显示, *Gadd45G* 的表达水平和 TNM 分期是食管鳞癌的独立预后指标, *Gadd45G* 高表达是食管鳞癌预后的有利因素, 而高 TNM 分期是食管鳞癌的不利预后因素。

## 3 讨论

*Gadd45A* 是 Fornace 等<sup>[11]</sup>于 1988 年用紫外线照射和甲磺酸甲脂处理中国仓鼠卵巢细胞时发现的, 由于紫外照射可以显著诱导其表达而引起人们的广泛关注。研究<sup>[12-14]</sup>发现, 在多种生长抑制及损伤因素作用下, 如紫外线照射、电离辐射、烷化剂、营养缺失、化疗药物等, 可导致 *Gadd45A* 表达迅速上调。Higashi 等<sup>[6]</sup>在人的非小细胞肺癌组织中发现,

表 2 食管鳞癌组织 *Gadd45A*、*Gadd45B* 和 *Gadd45G* 蛋白的表达与临床病理特征之间的关系Tab.2 Relationship between the expression of *Gadd45A*, *Gadd45B* and *Gadd45G* in ESCC tissues and clinicopathologic features

Feature	N	Gadd45A			Gadd45B		Gadd45G	
		Nucleus <i>n</i> ( % )	Cytoplasm <i>n</i> ( % )	<i>P</i>	<i>n</i> ( % )	<i>P</i>	<i>n</i> ( % )	<i>P</i>
Paracancerous tissues	128	99( 77.3 )	0( 0.0 )		105( 82.0 )		108( 84.4 )	
Tumor tissues	128	66( 51.6 )	50( 39.1 )	0.000	109( 85.2 )	0.500	42( 32.8 )	0.000
Age( <i>t/a</i> )								
< 50	31	14( 45.2 )	13( 41.9 )		27( 87.1 )		9( 29.0 )	
≥ 50	97	52( 53.6 )	37( 38.1 )	0.546	82( 84.5 )	0.727	33( 34.0 )	0.607
Gender								
Male	92	48( 52.2 )	37( 40.2 )		77( 83.7 )		31( 33.7 )	
Female	36	18( 50.0 )	13( 36.1 )	0.878	32( 88.9 )	0.457	11( 30.5 )	0.734
TNM stage								
I + II	69	41( 59.4 )	20( 29.0 )		56( 81.1 )		29( 42.0 )	
III + IV	59	25( 42.4 )	30( 50.8 )	0.018	53( 89.8 )	0.169	13( 22.0 )	0.016
Differentiation degree								
Well/Moderate	81	45( 55.5 )	28( 34.5 )		67( 82.7 )		32( 39.5 )	
Poor	47	21( 44.7 )	22( 46.8 )	0.179	42( 89.4 )	0.308	10( 21.3 )	0.034

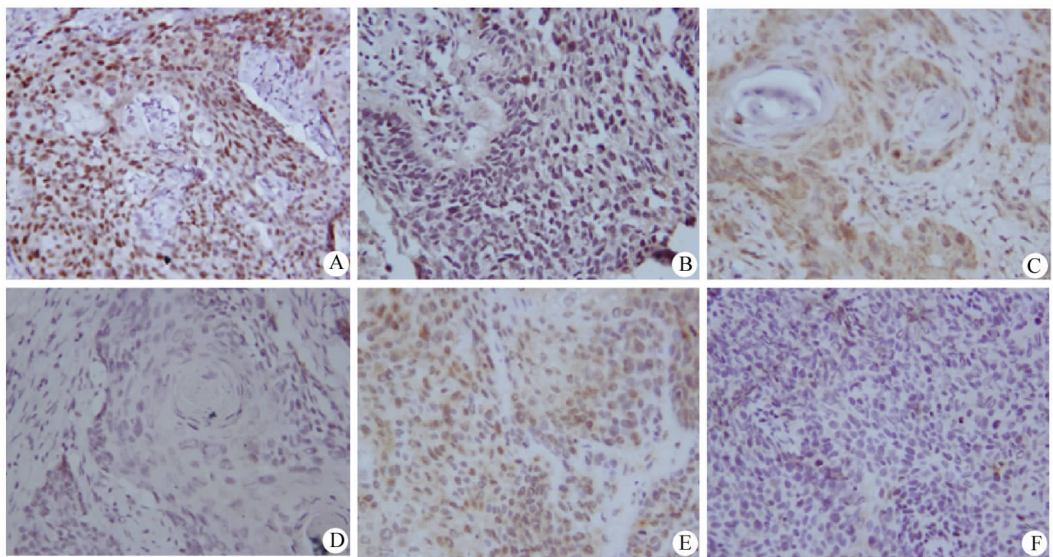
图 2 食管鳞癌组织中 *Gadd45A*、*Gadd45B* 和 *Gadd45G* 蛋白的表达( SP 染色,  $\times 400$  )Fig. 2 Expressions of *Gadd45A*, *Gadd45B* and *Gadd45G* protein in ESCC tissues ( SP staining,  $\times 400$  )A: Nucleus staining of *Gadd45A*; B: Cytoplasm staining of *Gadd45A*; C: Positive staining of *Gadd45B*;D: Negative staining of *Gadd45B*; E: Positive staining of *Gadd45G*; F: Negative staining of *Gadd45G*

表 3 食管鳞癌中 Gadd45A 和 Gadd45G 蛋白表达的相关性

Tab. 3 Relationship between expressions of Gadd45A and Gadd45G protein in ESCC tumor tissues

Gadd45A expression	Gadd45G expression		$\chi^2$	P
	+	-		
Nucleus	25	41	2.367	0.306
Cytoplasm	15	35		
Negative	2	10		

表 5 食管鳞癌患者预后的 Cox 多因素回归分析

Tab. 5 Multivariate regression analysis of ESCC patients' prognosis

Variable	SE	P	Odds ratio (95% CI)
Age	0.429	0.523	0.795(0.312 - 1.698)
Gender	0.351	0.489	1.225(0.724 - 2.056)
TNM stage	0.300	0.000	5.666(3.149 - 7.863)
Differentiation	0.422	0.269	2.058(0.815 - 6.021)
Gadd45A	0.387	0.627	0.829(0.388 - 1.768)
Gadd45B	0.275	0.714	1.106(0.645 - 1.897)
Gadd45G	0.330	0.001	2.963(1.552 - 5.656)

表 4 食管鳞癌患者的 5 年生存率 Log-rank 分析

Tab. 4 Univariate analysis of 5-year survival rate in ESCC cases (Log-rank test)

Group	OS	P
Age (t/a)		
<50	23	0.289
≥50	31	
Gender		
Male	30	0.236
Female	28	
TNM stage		
I + II	36	0.001
III + IV	21	
Differentiation degree		
Well/Moderate	30	0.314
Poor	27	
Gadd45A		
Positive	33	0.397
Negative	30	
Gadd45B protein expression		
Positive	28	0.401
Negative	35	
Gadd45G		
Positive	44	0.001
Negative	21	

OS: overall survival of 5 years

Gadd45A 的 mRNA 表达水平比正常人肺组织中的表达水平低大约 10 倍, 在乳腺癌<sup>[5]</sup>和前列腺癌<sup>[15]</sup>组织中也同样发现 Gadd45A 的表达显著降低。但是也有部分癌组织 Gadd45A 的表达未见明显下调, 如 Schneider 等<sup>[16]</sup>发现, 在胰腺导管腺癌中, Gadd45A mRNA 和蛋白水平的表达都是增高的, 在恶性胶质瘤中也发现 Gadd45A 的表达升高<sup>[10]</sup>, 过度表达的 Gadd45A 反而促进了某些肿瘤的发生发展。本研究发现, Gadd45A 蛋白在食管鳞癌和癌旁组织中的表达模式上存在明显的差异, 在癌旁组织中主要表现为细胞核表达模式, 而在部分癌组织中, 表现为细胞质表达模式。已有研究表明, Gadd45A 是一个细胞核蛋白, 定位于核斑, 它的核转位作用可能对细胞周期 G<sub>2</sub>/M 监测点的调控起关键作用<sup>[2]</sup>。细胞质内合成的核蛋白需要经由核孔复合体转运到细胞核才能发挥作用。因此推测, 在食管鳞癌中, 可能由于 Gadd45A 的核转位异常导致其功能受到影响, 从而促进了食管鳞癌的发生发展, 但具体机制尚需进一步研究。

Gadd45B 基因最初是通过 IL-6 对小鼠髓样细胞性白血病的细胞株 M1 终末分化诱导后所产生的髓样分化反应基因, 其进化较为保守, 与其他成员结构上较为相似, 可调节细胞的增殖、监测细胞周期、诱导细胞凋亡、调控细胞的负性生长<sup>[17]</sup>。Qiu 等<sup>[18]</sup>发现在肝细胞癌中 Gadd45B 的表达显著降低, 同时还发现, 在结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、淋巴瘤以及平滑肌肉瘤中 Gadd45B 的表达并无显著降低, 提示 Gadd45B 的表达降低可能是肝细胞癌所特有的分子事件, 在随后的研究<sup>[7]</sup>中也逐渐证实此观点。本研究未发现 Gadd45B 在食管鳞癌组织及癌旁组织中

的表达有显著性差异,且其表达对食管鳞癌患者的预后无明显影响,提示在食管鳞癌的发生、发

展过程中 *Gadd45B* 可能不起主要的作用。

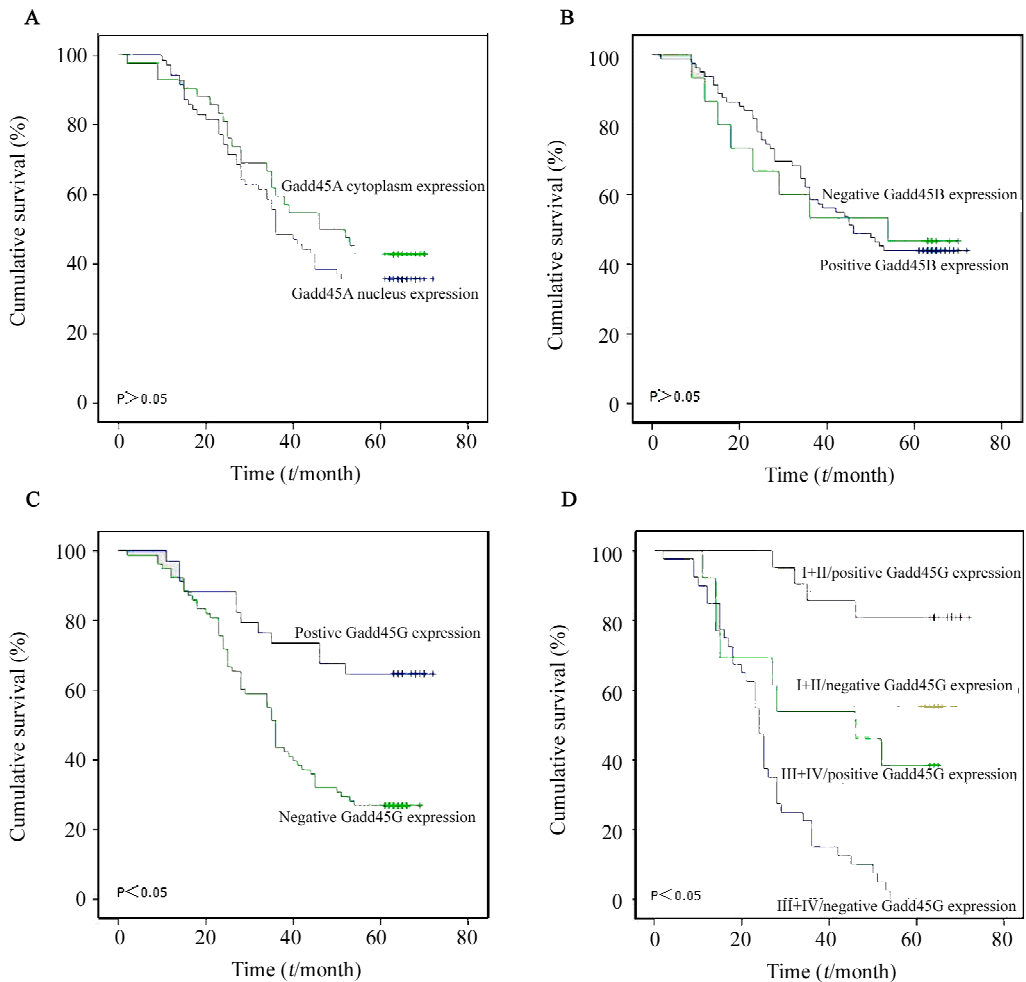


图3 食管鳞癌组织中 *Gadd45A*、*Gadd45B* 和 *Gadd45G* 蛋白的表达与食管鳞癌患者生存曲线分析

Fig. 3 Expression of *Gadd45A*, *Gadd45B* and *Gadd45G* and those Kaplan-Meier survival curves analysis in ESCC patients

A: *Gadd45A* expression; B: *Gadd45B* expression; C: *Gadd45G* expression; D: *Gadd45G* expression in different staging of ESCC

*Gadd45G* 基因与 *Gadd45* 家族的另两个成员在基因组水平有 65% 的同源性,在氨基酸水平有 40% 同源性,*Gadd45G* 基因表达的缺失可致人类细胞的无限增殖,从而引起肿瘤的形成。Bahar 等<sup>[19]</sup>发现,在脑垂体腺瘤中 *Gadd45G* 的表达降低,随后 Ying 等<sup>[20]</sup>发现,*Gadd45G* 在非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、鼻咽癌、宫颈癌、肺癌中均有不同程度的表达降低。Zhang 等<sup>[9]</sup>最近发现,此基因在胃癌、胰腺癌中可表达降低并伴随启动子区高甲基化。本研究发现,*Gadd45G* 在食管鳞癌中表达明显降低,并与肿瘤的 TNM 分期以及组织学分化密切相关,且 *Gadd45G* 高表达病例的预后情况明显好于 *Gadd45G* 低表达病例,提示此

基因在食管鳞癌的发生、发展及预后中扮演着重要的角色。同时,本研究还发现,*Gadd45G* 蛋白的高表达是食管鳞癌的一个独立预后因素,检测食管鳞癌组织中 *Gadd45G* 蛋白的表达水平,有可能可以较为准确地评价患者的预后,有助于临床筛选高复发转移风险的病例,从而为肿瘤的个体化辅助治疗提供科学的依据。

总之,本研究结果提示,虽然 *Gadd45G* 基因家族三个成员的基因序列同源性很高,但它们在食管鳞癌的发生、发展中所起的作用可能不同,其中 *Gadd45G* 的表达有望成为预测食管鳞癌发展及转归的重要分子生物学标志物。



[ 参考文献 ]

[ 1 ] Niehrs C, Schäfer A. Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair [ J ]. Trends Cell Biol, 2012, 22( 4 ): 220-227.

[ 2 ] Rosemary Sifakakos A, Richardson DR. Growth arrest and DNA damage-45 alpha ( Gadd45Alpha ) [ J ]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41( 5 ): 986-989.

[ 3 ] Yang Z, Song L, Huang C. Gadd45 proteins as critical signal transducers linking NF-kappaB to MAPK cascades [ J ]. Curr Cancer Drug Targets, 2009, 9( 8 ): 915-930.

[ 4 ] Tamura RE, de Vasconcellos JF, Sarkar D, et al. GADD45 proteins: Central players in tumorigenesis [ J ]. Curr Mol Med, 2012, 12( 5 ): 634-651.

[ 5 ] 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.

[ 6 ] Higashi H, Vallböhmer D, Warnecke-Eberz U, et al. Down-regulation of Gadd45 expression is associated with tumor differentiation in non-small cell lung cancer [ J ]. Anticancer Res, 2006, 26( 3A ): 2143-2147.

[ 7 ] Ou DL, Shen YC, Yu SL, et al. Induction of DNA damage-inducible gene Gadd45Beta contributes to sorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells [ J ]. Cancer Res, 2010, 70( 22 ): 9309-9318.

[ 8 ] Liebermann DA, Hoffman B. Prostate cancer: JunD, Gadd45A and Gadd45G as therapeutic targets [ J ]. Cell Cycle, 2011, 10( 20 ): 3428.

[ 9 ] Zhang W, Li T, Shao Y, et al. Semi-quantitative detection of GADD45-gamma methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers using methylation-sensitive high-resolution melting analysis [ J ]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136( 8 ): 1267-1273.

[ 10 ] Reddy SP, Britto R, Vinnakota K, et al. Novel glioblastoma markers with diagnostic and prognostic value identified through transcriptome analysis [ J ]. Clin Cancer Res, 2008, 14( 10 ): 2978-2987.

[ 11 ] Fornace AJ Jr, Alamo I Jr, Hollander MC. DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A,

1988, 85( 23 ): 8800-8804.

[ 12 ] Hollander MC, Alamo I, Jackman J, et al. Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage [ J ]. J Biol Chem, 1993, 268( 32 ): 24385-24393.

[ 13 ] Xu K, Zhou Y, Qiu W, et al. Activating transcription factor 3 ( ATF3 ) promotes sublytic C5b-9-induced glomerular mesangial cells apoptosis through up-regulation of Gadd45 $\alpha$  and KLF6 gene expression [ J ]. Immunobiology, 2011, 216( 8 ): 871-881.

[ 14 ] Hughes KJ, Meares GP, Chambers KT, et al. Repair of nitric oxide-damaged DNA in beta-cells requires JNK-dependent Gadd45Alpha expression [ J ]. J Biol Chem, 2009, 284( 40 ): 27402-27408.

[ 15 ] Ramachandran K, Gopisetty G, Gordian E, et al. Methylation-mediated repression of Gadd45Alpha in prostate cancer and its role as a potential therapeutic target [ J ]. Cancer Res, 2009, 69( 4 ): 1527-1535.

[ 16 ] Schneider G, Weber A, Zechner U, et al. Gadd45Alpha is highly expressed in pancreatic ductal adenocarcinoma cells and required for tumor cell viability [ J ]. Int J Cancer, 2006, 118( 10 ): 2405-2411.

[ 17 ] Abdollahi A, Lord KA, Hoffman-Liebermann B, et al. Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: A novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines [ J ]. Oncogene, 1991, 6( 1 ): 165-167.

[ 18 ] Qiu W, Zhou B, Zou H, et al. Hypermethylation of growth arrest DNA damage-inducible gene 45 beta promoter in human hepatocellular carcinoma [ J ]. Am J Pathol, 2004, 165( 5 ): 1689-1699.

[ 19 ] Bahar A, Bicknell JE, Simpson DJ, et al. Loss of expression of the growth inhibitory gene Gadd45Gamma, in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation [ J ]. Oncogene, 2004, 23( 4 ): 936-944.

[ 20 ] Ying J, Srivastava G, Hsieh WS, et al. The stress-responsive gene GADD45G is a functional tumor suppressor, with its response to environmental stresses frequently disrupted epigenetically in multiple tumors [ J ]. Clin Cancer Res, 2005, 11( 18 ): 6442-6449.

[ 收稿日期 ] 2013 -03 -26                      [ 修回日期 ] 2013 -05 -25  
 [ 本文编辑 ] 黄静怡



本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 ..... 封二

华威国际(香港)有限公司北京华威中仪科技有限公司 ..... 封三

碧迪医疗器械有限公司 ..... 封四

上海白泽生物基因发展有限公司 ..... 插页