

## • 临床论著 •

## WBOX 与 p73 蛋白在乳腺癌组织中的表达及相关性研究

东星 李锐 于波 周卫东

**【摘要】** 目的 探讨 WBOX 与 p73 蛋白在乳腺癌组织中的表达及其相关性。方法 采用免疫组织化学方法检测 60 例浸润性乳腺癌、20 例乳腺纤维腺瘤及 20 例乳腺癌旁组织中 WBOX 和 p73 的表达情况。结果 WBOX 在浸润性乳腺癌组织中的表达(13.3%)明显低于乳腺纤维腺瘤组织(35.0%) ( $P < 0.05$ ), 乳腺纤维腺瘤组织中的表达明显低于乳腺癌旁组织(75.0%) ( $P < 0.05$ )。WBOX 的表达与有无淋巴结转移、分化程度、TNM 分期、术后复发及 ER 受体密切相关 ( $P < 0.05$ )。p73 在乳腺癌组织中的表达(80.0%)明显高于乳腺纤维腺瘤组织(55.0%) ( $P < 0.05$ ), 乳腺纤维腺瘤组织中的表达明显高于乳腺癌旁组织(15.0%) ( $P < 0.05$ )。p73 的表达与有无淋巴结转移、术后复发、ER 受体密切相关 ( $P < 0.05$ )。WBOX 与 p73 在浸润性乳腺癌组织中的表达呈负相关 ( $r = -0.489, P < 0.05$ )。结论 WBOX 和 p73 参与调控乳腺癌的发生、发展,联合检测 WBOX 和 p73 对预测乳腺癌的发生、发展及评估乳腺癌患者的预后具有重要意义。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 免疫组织化学; WBOX; p73

**Expression and correlation of WBOX and p73 protein in breast carcinoma** DONG Xing, LI Rui, YU Bo, ZHOU Wei-dong. Department of General Surgery, Beijing Command General Hospital, Beijing 100700, China  
Corresponding author: DONG Xing, Email: x2728@tom.com

**【Abstract】 Objective** To study the expression and correlation of WBOX and p73 in breast carcinoma. **Methods** Immunochemical method was performed to detect the expression of WBOX and p73 in 60 cases of breast carcinoma, 20 cases of benign breast tissues and 20 cases of cancer surrounding tissues. **Results** Expression of WBOX in breast carcinoma tissue (13.3%) was significantly lower than that in benign breast tissues (35.0%) ( $P < 0.05$ ). The latter was significantly lower than that in cancer surrounding tissues (75.0%) ( $P < 0.05$ ). The expression of p73 was closely related to lymph node metastasis, cytodifferentiation, TNM stages, postoperative recurrence, estrogen receptor and HER-2 receptor ( $P < 0.05$ ). Expression of p73 in breast carcinoma tissue (80.0%) was significantly higher than that in benign breast tissues (55.0%) ( $P < 0.05$ ). The latter was significantly higher than that in cancer surrounding tissues (15.0%) ( $P < 0.05$ ). p73 was closely related to lymph node metastasis, postoperative recurrence, estrogen receptor, HER-2 receptor ( $P < 0.05$ ). The expression of WBOX was negative correlated with p73 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** WBOX and p73 might play an important role in occurrence and development of breast carcinoma. The combined detection of WBOX and p73 might be a more appropriate method to identify the formation and development of breast carcinoma and to predict the prognosis of breast carcinoma.

**【Key words】** Breast carcinoma; Immunohistochemical; WBOX; p73

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤之一,虽然目前其治愈率有了很大提高,但其复发及转移仍是威胁患者生命的主要因素。因此研究其发病机制,寻找治疗新的靶点至关重要。目前研究认为,正常细胞转变为癌细胞,浸润到邻近组织或转移到远隔器官是一个复杂的、多步骤的基因改变,其中癌基因的激活和抑癌基因的

失活在肿瘤的发生、发展中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。WBOX (WW domain-containing oxidoreductase) 基因是近年来发现的一个可能的肿瘤抑制基因,跨越了整个常见染色体脆性位点 FRA 16D,在许多人类恶性肿瘤中表达减少或缺失<sup>[3]</sup>。p73 是 p53 基因家族中的新发现成员基因,位于人类 1 号染色体短臂的着丝粒 1p36.33 区域,该区域是多个抑癌基因位点<sup>[4]</sup>。我们应用免疫组化法检测了乳腺癌组织中 WBOX 和 p73 的表达,旨在探讨它们在乳腺癌发生发展中的意义及相互关系。

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.10.022

作者单位:100700 北京军区总医院普通外科(东星、于波);解放军 65635 部队卫生队(李锐);解放军第 205 医院普通外科(周卫东)

通讯作者:东星,Email:x2728@tom.com

表1 WWOX在乳腺癌、乳腺纤维腺瘤、乳腺癌旁组织中的表达

组别	例数	阳性(例)	阴性(例)	阳性率(%)	$\chi^2$ 值	P值
癌旁组织	20	15	5	75.0	6.465 <sup>a</sup>	0.011 <sup>a</sup>
乳腺纤维腺瘤	20	7	13	35.0	4.622 <sup>b</sup>	0.032 <sup>b</sup>
乳腺癌	60	8	52	13.3	24.917 <sup>c</sup>	0.000 <sup>c</sup>

注:<sup>a</sup>:乳腺癌旁组织 vs. 乳腺纤维腺瘤;<sup>b</sup>:乳腺纤维腺瘤 vs. 乳腺癌;<sup>c</sup>:乳腺癌旁组织 vs. 乳腺癌

表2 p73在乳腺癌、乳腺纤维腺瘤、乳腺癌旁组织中的表达

组别	例数	阳性(例)	阴性(例)	阳性率(%)	$\chi^2$ 值	P值
癌旁组织	20	3	17	15.0	7.033 <sup>a</sup>	0.008 <sup>a</sup>
乳腺纤维腺瘤	20	11	9	55.0	4.843 <sup>b</sup>	0.028 <sup>b</sup>
乳腺癌	60	48	12	80.0	27.424 <sup>c</sup>	0.000 <sup>c</sup>

注:<sup>a</sup>:乳腺癌旁组织 vs. 乳腺纤维腺瘤;<sup>b</sup>:乳腺纤维腺瘤 vs. 乳腺癌;<sup>c</sup>:乳腺癌旁组织 vs. 乳腺癌

### 资料与方法

1. 一般资料:选择2007年5月至2009年5月在解放军第205医院普外科手术并获其目前转移等情况资料的女性乳腺浸润性导管癌石蜡包埋组织60例,年龄27~65岁,中位年龄43岁;所有患者术前均未进行放、化疗及内分泌治疗。按UICC 2003年TNM分期:I期13例、II期14例、III~IV期33例;有淋巴结转移28例、无淋巴结转移32例;术后随访3~5年,无复发者31例,出现胸壁复发或锁骨上淋巴结或骨、肺、肝、脑转移者29例。另外分别取20例乳腺纤维腺瘤及20例癌旁组织(>5 cm)作对照。

2. 试剂和方法:兔抗人WWOX单克隆抗体为迈新生物技术开发有限公司产品,抗体稀释浓度为1:100;鼠抗人p73单克隆抗体为北京中杉金桥生物公司产品,抗体稀释浓度为1:100。SP免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。以已知阳性片作阳性对照,以PBS代替一抗作阴性对照。

3. 染色结果判断:以细胞质染色有清晰淡黄色至棕黄色颗粒为阳性,胞核偶见着色。每例切片随机选取10个高倍视野进行结果判定,按染色强度及阳性细胞数占肿瘤细胞总数的百分比综合计分。染色强度:无色计为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;阳性细胞数:小于总数的5%时计为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,大于50%为3分。染色强度得分与阳性细胞数得分相乘,0~1分为阴性,≥2分为阳性(+).

4. 统计学分析:应用SPSS 11.0统计软件包对所得数据进行 $\chi^2$ 检验及Spearman相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

#### 1. WWOX在乳腺癌、乳腺纤维腺瘤和乳腺癌旁组

织的表达:WWOX阳性表达主要位于胞质内,其在乳腺癌组织中的表达率(13.3%,8/60)显著低于乳腺纤维腺瘤组织(35.0%,7/20)( $P < 0.05$ )。乳腺纤维腺瘤组织中的表达率明显低于乳腺癌旁组织(75.0%,15/20)( $P < 0.05$ )。见表1;图1,2。

2. p73在乳腺癌、乳腺纤维腺瘤和乳腺癌旁组织的表达:p73阳性表达主要位于胞浆和胞膜内,其在乳腺癌组织中的表达率(80.0%,48/60)显著高于乳腺纤维腺瘤组织(55.0%,11/20)( $P < 0.05$ )。乳腺纤维腺瘤组织中的表达率明显高于乳腺癌旁组织(15.0%,3/20)( $P < 0.05$ )。见表2;图3,4。

3. WWOX、p73的表达与乳腺癌的临床病理学关系:WWOX在乳腺癌组织中的表达与年龄、肿瘤大小无关( $P > 0.05$ );与有无淋巴结转移、分化程度、TNM分期、术后复发及ER受体密切相关( $P < 0.05$ )。p73表达与年龄、肿瘤大小、肿瘤分化、TNM分期无关( $P > 0.05$ );与有无淋巴结转移、术后复发、ER受体密切相关( $P < 0.05$ )。见表3。

4. 乳腺癌中WWOX与p73表达的关系:WWOX表达阳性的8例乳腺癌中,4例p73表达阴性。WWOX表达阴性的52例乳腺癌中,44例p73表达阳性,经Spearman等级相关分析发现WWOX与p73之间存在明显负相关( $r = -0.489, P < 0.05$ )。见表4。

表4 WWOX与p73表达的关系(例)

p73	WWOX		合计
	-	+	
-	8	4	12
+	44	4	48
合计	52	8	60

表3 WWOX、p73的表达与乳腺癌的临床病理学关系(例)

病理因素	例数	WWOX				p73			
		+	-	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	+	-	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
年龄				0.024	>0.05			1.406	>0.05
≤40岁	36	5	31			27	9		
>40岁	24	3	21			21	3		
肿瘤大小				1.758	>0.05			1.791	>0.05
≤3 cm	42	4	38			36	6		
>3 cm	18	4	14			12	6		
分化程度				4.329	<0.05			0.067	>0.05
高中分化	32	7	25			26	6		
低分化	28	1	27			22	6		
肿瘤复发				4.746	<0.05			6.023	<0.05
复发	29	1	28			27	2		
未复发	31	7	24			21	10		
ER受体				4.219	<0.05			3.857	<0.05
(+)	25	6	19			17	8		
(-)	35	2	33			31	4		
PR受体				0.209	>0.05			3.533	>0.05
(+)	33	5	28			23	10		
(-)	27	3	24			25	2		
淋巴结转移				4.329	<0.05			5.424	<0.05
有	28	1	27			26	2		
无	32	7	25			22	10		
TNM分期				6.737	<0.01			1.077	>0.05
I~II	27	7	20			20	7		
III~IV	33	1	32			28	5		

## 讨 论

1. WWOX与乳腺癌:含有WW结构域的氧化还原酶基因(WWOX)是2000年Bednarek等<sup>[5]</sup>应用鸟枪基因测序技术,通过对感兴趣区域的转录子进行分离分析的方法鉴别出的一种抑癌基因,该基因位于染色体FRA16D脆性位点上,在环境致癌物等作用下易失活。WWOX蛋白含有414个氨基酸,是一种促凋亡蛋白,参与多种信号转导途径。已有研究表明,WWOX在一些肿瘤中低表达或表达缺失,如肺小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌、卵巢癌、食管鳞状上皮细胞癌、胆囊癌等<sup>[6-8]</sup>。本研究结果显示,WWOX在乳腺癌组织中表达率很低,仅为13.3%,而在乳腺纤维腺瘤组织中的表达率为35%,乳腺癌旁组织中的表达率达75%,三组之间比较差异有统计学意义,提示WWOX蛋白的低表达可能在乳腺癌的发生发展中起了重要作用。WWOX表达降低导致乳腺癌发生的可能机制为:(1)研究表明WWOX

为肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )介导的细胞凋亡过程中必不可少的中介物,TNF通过诱导线粒体膜通透性的改变导致WWOX从线粒体释放,促进细胞的凋亡。WWOX蛋白低表达甚至失活时,影响TNF的作用过程,从而降低或丧失对细胞凋亡的控制,导致肿瘤的发生。(2)WWOX可通过p53途径诱导细胞凋亡。使用WWOX基因敲除鼠研究发现,当WWOX基因表达被阻断后,p53表达下降或缺失,p53诱导的细胞凋亡也随之消失。在细胞内WWOX发生第33位酪氨酸磷酸化,磷酸化的WWOX可以与同样发生磷酸化的p53的第46位丝氨酸结合,从而起到稳定p53,防止其降解的作用。WWOX通过与p53的结合实现协同诱导细胞凋亡的功能<sup>[9]</sup>。(3)WWOX可下调抗凋亡因子Bcl-2、Bcl-x1的表达,从而增强TNF介导的细胞毒性;同时增强TRADD介导的细胞死亡,来促进细胞凋亡。另外,本研究发现WWOX在乳腺癌中表达情况与年龄、肿瘤大小无关,而与分化程度、有无淋巴结转移、TNM分期、术

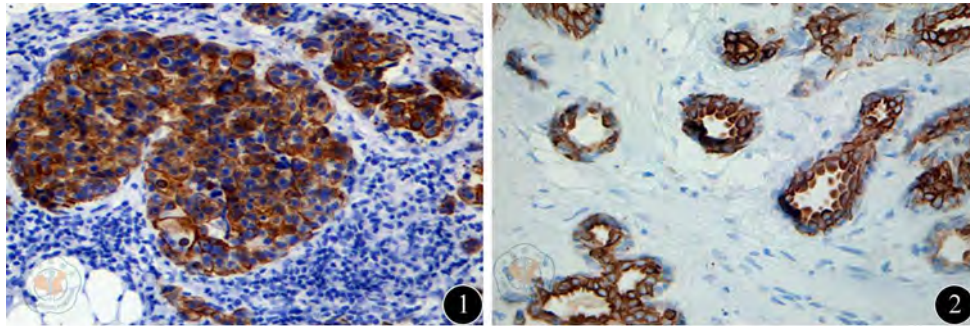


图1 WWOX在浸润性乳腺癌中阳性表达 (SP × 200) 图2 WWOX在乳腺纤维腺瘤中阳性表达 (SP × 200)

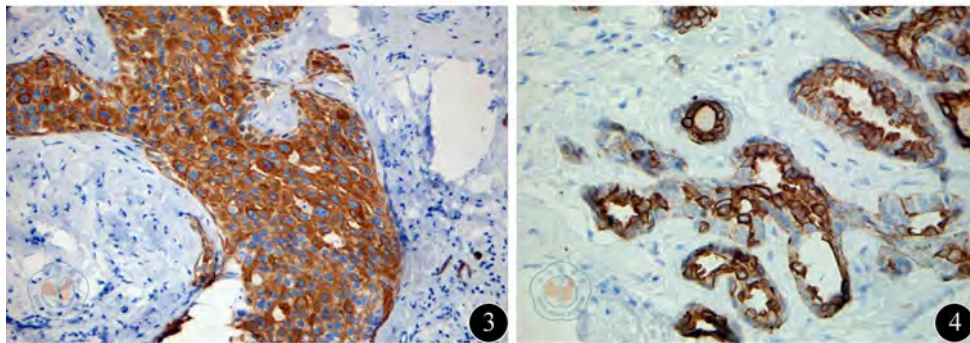


图3 p73在浸润性乳腺癌中阳性表达 (SP × 200) 图4 p73在乳腺纤维腺瘤中阳性表达 (SP × 200)

后复发及 ER 受体密切相关,提示 WWOX 蛋白在乳腺癌的发生及预后中起了重要作用,WWOX 表达的降低可以影响乳腺癌的生物学行为,使其更易发生转移、复发等恶性行为,WWOX 有可能成为判断乳腺癌预后的重要指标,修复乳腺癌细胞中的 WWOX 基因有可能成为今后治疗此肿瘤的重点。

2. p73 与乳腺癌:p73 基因定位、结构与克隆是由 Dickman 等在寻找新的细胞介素的过程中发现的一个假阳性 cDNA,编码与 p53 结构相似的蛋白,序列分析证实与 p53 基因有显著同源性,称该基因为 p73 基因。既往研究认为,p73 可应用细胞凋亡调控因子 PUMA 和凋亡促进基因 BAX 作为媒介经过线粒体途径诱导细胞凋亡,因此是一种候选的抑癌基因。但新近研究发现,p73 表达的升高与肿瘤的发生有关<sup>[10]</sup>。本研究发现,p73 在乳腺癌中的表达率明显高于乳腺纤维腺瘤组织,且在乳腺纤维腺瘤组织中的阳性表达明显高于乳腺癌旁组织,提示 p73 的异常表达参与了乳腺癌的发生、发展。进一步分析发现,p73 的表达与有无淋巴结转移、术后复发、ER 受体密切相关,提示 p73 的高表达与乳腺癌细胞的浸润、转移有关,可能作为评估乳腺癌生物学行为和判断预后的指标。p73 诱导肿瘤发生的机制可能为:(1)MDM2 是 p53 活性的主要调节因子,它不但可以通过掩盖 p53 的转录激活区从而抑制 p53 转录因子的活性,还能够以 p53 为靶基因,经由泛酸介导的途径降解。p73 通过诱导 MDM2 表达,促进 p53 的

降解,从而促进肿瘤的发生<sup>[11]</sup>。(2)研究者发现  $\Delta Np73$  是肿瘤中 p73 基因表达的主要形式,其启动子无法激活 p53 靶基因的转录,却可被 p53 诱导,并且能通过抑制 p53 和 TA p73 依赖的转录激活而对细胞凋亡有阻遏作用<sup>[12]</sup>。(3)Wilhelm 等<sup>[13]</sup>研究发现, $\Delta Np73\beta$  可与 53BP1 直接作用从而抑制 p53 的活化,诱导肿瘤发生,并促进肿瘤的生长和血管形成,导致肿瘤的移位、转移。

3. WWOX 及 p73 在乳腺癌组织中表达的相关性:研究发现,p73 的 PPPY 序列能与 WWOX 的第一个 WW 结构域相互作用,同时,酪氨酸激酶 Src 可以使第一个 WW 结构域的酪氨酸 33 磷酸化,从而增强 WWOX 与 p73 的结合<sup>[14]</sup>。另有研究发现,将 WWOX 基因转染至肿瘤细胞后发现 p73 的定位从细胞核转至细胞质,并且 p73 的促凋亡作用明显增强。本研究结果显示:WWOX 及 p73 在乳腺癌组织中的表达呈负相关,推测当 WWOX 缺失或部分表达时将减弱 p73 和 p53 的促凋亡作用,从而参与乳腺癌的发生。

总之,WWOX 及 p73 参与了乳腺癌的发生、发展,检测两者的表达对乳腺癌的诊断、分期及预后判断有一定的参考意义,并可能成为肿瘤基因治疗的新靶点。

#### 参 考 文 献

- [1] Paul SP, Joe GR. A new treasure in the breast cancer gene hunt. *Nature Medicine*, 2011, 17:422-423.
- [2] Nault JC, Amaddeo GL, Jessica ZR. When activated oncogene meets immunity: A fight to prevent liver tumor initiation. *Hepatology*, 2012,

- 56;387-389.
- [3] Fu Jing, Qu ZX, Yan PR, et al. The tumor suppressor gene WWOX links the canonical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathways in HTLV-I Tax-mediated tumorigenesis. *Blood*, 2011, 117:1652-1661.
- [4] Zhang Yang, Sturgis EM, Huang ZG, et al. Genetic variants of the P53 and P73 genes jointly increase risk of second primary malignancies in patients after index squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 2012, 118:485-492.
- [5] Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, et al. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res*, 2000, 60:2140-2145.
- [6] Iliopoulos D, Guler G, Han SY, et al. Fragile gene as biomarkers; epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer. *Oncogene*, 2005, 24:1625-1633.
- [7] Chao Lan, Wang CG, Bu YL, et al. Aberrant expression of WWOX protein in epithelial ovarian cancer: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Int J Gynecol Pathol*, 2012, 31:125-132.
- [8] 程邦君, 赵登秋, 邬叶锋, 等. WWOX 抑癌基因和 Nr2 转录因子在胆囊癌组织中的表达及相关性研究[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6:2348-2352.
- [9] Chang NS, Doherty J, Ensign A, et al. WOX1 is essential for tumor necrosis factor, UV light, staurosporine, and p53-mediated cell death, and its tyrosine 33-phosphorylated form binds and stabilizes serine 46-phosphorylated p53. *Biol Chem*, 2005, 280:43100-43108.
- [10] Guan X, Zhang N, Yin Y, et al. Polymorphisms in the p63 and p73 genes are associated with ovarian cancer risk and clinicopathological variables. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 24:31-89.
- [11] Zawacka-Pankau J, Kostecka A, Sznarkowska A, et al. p73 tumor suppressor protein; a close relative of p53 not only in structure but also in anticancer approach? *Cell Cycle*, 2010, 9:720-728.
- [12] Mattson MP, Ashery U. No more brain tangles with Np73. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34:6-8.
- [13] Wilhelm MT, Rufini A, Wetzel MK, et al. Isoforms specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev*, 2010, 24:549-560.
- [14] Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, et al. Functional association between WWOX tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *PNAS*, 2004, 101:4401-4406.

(收稿日期:2013-02-06)

(本文编辑:梁雷)

东星, 李锐, 于波, 等. WWOX 与 p73 蛋白在乳腺癌组织中的表达及相关性研究[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(10):4231-4235.

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION  
1915  
中華醫學會