

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.01.009

胃癌组织 Wnt10b 的表达及意义^{*}

王 林^{1,2} 许晓群¹ 王郡甫^{1△}

(1 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东 济南 250062; 2 济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272011)

摘 要 目的 检测胃癌及癌旁组织中 Wnt10b 的表达,探讨其与临床病理参数的关系。**方法** 收集 25 例胃癌患者手术切除的癌组织及对应的癌旁组织,用实时荧光定量 PCR 检测 Wnt10b mRNA 的表达,Western-blot 技术检测 Wnt10b 蛋白的表达,分析 Wnt10b mRNA 在胃癌组织中的表达与临床病理参数的关系。**结果** 胃癌组织中 Wnt10b mRNA 和蛋白表达水平明显高于癌旁组织 ($P < 0.001$),胃癌组织中 Wnt10b mRNA 表达阳性率与肿瘤远处转移相关 ($P < 0.05$),但与年龄、性别、肿瘤大小、TNM 分期、分化程度和浸润深度无关。**结论** Wnt10b 在胃癌组织中呈活化状态,可能参与胃癌的发生发展。

关键词 胃癌; Wnt10b; 实时荧光定量 PCR; Western-blot

中图分类号: R735.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2014)02-030-04

Expression of Wnt10b in gastric cancer tissue and its significance

WANG Lin, XU Xiao-qun, WANG Jun-fu

(School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

Abstract: Objective This study aimed to detect the expression of Wnt10b in paired tumor and non-cancerous tissues of gastric cancer (GC) patients and explore correlation of Wnt10b mRNA expression with the clinicopathological parameters of GC. **Methods** The surgically resected paired cancerous and adjacent non-cancerous tissues of 25 GC patients were collected. The expression of Wnt10b mRNA was examined by Quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Western-blot was employed to detect Wnt10b protein levels. Correlation between Wnt10b mRNA expression and clinicopathological parameters was analyzed. **Results** The levels of Wnt10b mRNA in cancerous tissues were higher compared with matching adjacent non-cancerous tissues ($P < 0.001$). The protein levels of Wnt10b were consistent with the expression levels of Wnt10b mRNA. Wnt10b mRNA expression was correlated with the lymph node metastasis of tumor ($P < 0.05$), but no association was found between Wnt10b mRNA expression and other clinicopathological parameters including age, gender, tumor size, TNM stage, differentiation stage and depth of invasion. **Conclusion** The expression levels of Wnt10b in cancerous tissues were higher than adjacent non-cancerous tissues, and there was correlation between the expression levels of Wnt10b and the lymph node metastasis of tumor.

Key words: Gastric cancer (GC); Wnt10b; Real time fluorescent quantitative PCR; Western-blot

在我国各种恶性肿瘤的发病率与死亡率中,胃癌位居前列^[1]。Wnt 信号是维持胚胎发育、组织完整性及干细胞功能必不可少的,该信号通路异常活化也是导致人类肿瘤发生最常见异常因素之一^[2-4]。原癌基因 Wnt10b 是 Wnt 基因家族成员

之一,其编码的分泌蛋白激活经典的 Wnt 信号通路。已报道, Wnt10b 高表达与乳腺癌、结直肠癌、骨肉瘤等肿瘤的发生发展及转移有关^[5-7]。但是,关于 Wnt10b 在胃癌组织中的表达及其意义未见报道。本文通过实时定量 PCR 及 Western-blot 技术检测胃癌及癌旁组织 Wnt10b mRNA 及蛋白表达水平差异并结合临床资料分析 Wnt10b 在胃癌发生发展中的意义,为研究胃癌的发生发展及其诊

^{*} [基金项目] 山东省自然科学基金 (ZR2009CM036, ZR2010CM067); 山东省大型科学仪器设备升级改造技术研究专项 (2013SJGZ09)

[△] [通信作者] 王郡甫, E-mail: wjf_1030@126.com

断提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 25 例标本选自 2012 年 10 月至 2013 年 5 月济宁医学院附属济宁市第一人民医院肿瘤外科和胃肠外科胃癌手术患者。入组标准为术前诊断为胃癌且术后病理证实,术前未经任何化疗和放疗。25 例中男 17 例,女 8 例;年龄 29~75 岁。其中,有区域淋巴结转移 20 例,无转移 5 例;中、高分化 7 例,低、未分化 18 例;TNM 分期: I~II 期 18 例,III~IV 期 7 例;浸润深度: T1 4 例, T2 15 例, T3 4 例, T4 2 例。标本取材分为癌组织 25 例,癌旁正常组织 25 例(距离肿瘤组织边缘 5cm 以上,经切片病理染色分析证实无癌变细胞)。

1.1.2 主要试剂和仪器 Trizol(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(日本 ToYoBo 公司);SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);小鼠抗 β -actin 抗体(美国 abcam 公司);HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(武汉博士德公司);兔抗 Wnt10b 抗体(美国 Santa Cruz 公司);HRP 标记的羊抗兔 IgG(Rockland 公司);内参基因 β -actin 及目的基因 Wnt10b 引物设计采用 Primer 软件,由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 仪(东盛创新科技有限公司),定量 PCR 仪(BIO-RAD CFX96)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 剪取胃癌组织一小块,剪碎置加入 1ml Trizol 试剂的研钵中迅速研磨成粉末状,转移至 1.5ml EP 管中反复吹打,采用异硫氰酸胍—酚—氯仿法提取总 RNA。核酸蛋白质检测仪测定 RNA 样品浓度。取紫外分光光度计测得 A260/A280 在 1.8~2.0 之间,且经琼脂糖凝胶电泳鉴定质量好的标本进行逆转录。

1.2.2 qRT-PCR 按 ToYoBo 公司逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, -20℃ 备用。Wnt10b: 上游为 5'-GGCTCCAGAATTGCGGTTGT-3', 下游为 5'-GGCGCCAGGTGGTAAGTGA-3'。 β -actin: 上游为 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3', 下游为 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。

目的基因的表达水平通过 β -actin 进行校准。以 cDNA 为模板,采用 TaKaRa 公司 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒进行 PCR 反应,总反应体

积为 20 μ l, 均按试剂说明书操作。

1.2.3 Western-blot 剪碎 20~40mg 新鲜组织,加入 1ml 预冷的蛋白裂解液,置冰浴用匀浆器充分匀浆后冰浴 10 min。将匀浆液转移至 EP 管中, 4℃ 12000rpm 离心 15min, 取上清置 -20℃ 保存。蛋白质样品分离用 80g/L SDS-PAGE, 每泳道上样量为 20 μ g, 100V 电压, 电泳 90~120min 后, 电转印至 PVDF 膜上。将膜与兔抗 Wnt10b 抗体(1:500), 室温孵育 2h, 漂洗后与 HRP 标志的羊抗兔 IgG(1:10000), 室温温育 1h; 然后与内参小鼠抗 β -actin 抗体(1:1000)室温孵育 2h, 漂洗后与 HRP 标志的山羊抗小鼠 IgG(1:5000), 室温孵育 1h; ECL 荧光显色, 凝胶成像系统记录结果。

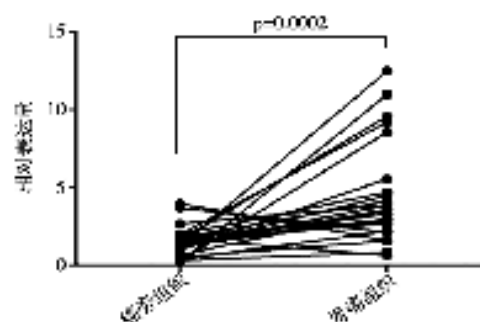
1.3 统计学方法

应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 Wnt10b mRNA

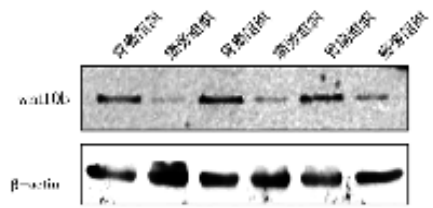
在胃癌和癌旁组织中的表达 应用人 Wnt10b 特异引物,以逆转录合成的 cDNA 为模板通过实时荧光定量 PCR 扩增目的基因,并计算其相对表达量。以目的基因 mRNA 的转录水平与内参基因 β -actin mRNA 的转录水平相对变化作为判断指标,分析胃癌组织与癌旁组织目的基因 mRNA 转录水平的差异。结果显示(图 1),胃癌组织 Wnt10b mRNA 转录水平显著高于癌旁组织($t=4.366, P=0.0002$)。



1:癌旁组织 Wnt10b mRNA 表达水平
2:胃癌组织 Wnt10b mRNA 表达水平
图 1 实时荧光定量 PCR 检测胃癌及癌旁组织 Wnt10b mRNA 表达水平

2.2 Wnt10b 蛋白质在胃癌和癌旁组织中的表达

Western-blot 结果显示胃癌组织 Wnt10b 的表达高于癌旁组织,与 Wnt10b mRNA 转录水平结果完全一致,如图 2。



1、3、5:胃癌组织 Wnt10b mRNA 蛋白表达水平
2、4、6:癌旁组织 Wnt10b mRNA 蛋白表达水平

图2 免疫印迹法检测胃癌及癌旁组织
Wnt10b 蛋白表达水平

2.3 胃癌组织 Wnt10b mRNA 表达与临床病理参数的关系

Wnt10b mRNA 在胃癌组织中的阳性表达与肿瘤淋巴结转移相关,但与年龄、性别、肿瘤大小、分化状态、浸润深度和肿瘤分期无关,见表1。

表1 胃癌组织 Wnt10b mRNA 表达
与临床病理参数的关系

临床病理参数		n	阳性	阴性	P
年龄(岁)	≤60	10	8	2	0.461
	>60	15	10	5	
性别	男	17	12	5	0.818
	女	8	6	2	
肿瘤大小(cm)	≤5	19	10	9	0.910
	>5	6	3	3	
TNM 分期	I + II	18	11	7	0.586
	III + IV	7	4	3	
分化程度	中、高分化	7	3	4	0.568
	低、未分化	18	10	8	
浸润深度	T1、T2	19	11	8	0.973
	T3、T4	6	4	2	
淋巴结转移	有	20	19	1	0.007
	无	5	2	3	

3 讨论

Wnt 蛋白是一类脂质修饰的分泌型糖蛋白家族,通过细胞表面受体介导的信号途径调控一系列的细胞行为,包括细胞分化、增殖、迁移、细胞极性以及基因的表达等^[8]。Wnt 蛋白与跨膜受体 Frizz-
zle 以及共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP5/LRP6) 结合,激活经典 Wnt 途径,使 β-
catenin 在胞质内积累,进而入核与 T 细胞受体/淋
巴增强因子(Tcf/Lef)形成转录复合物,激活下游
靶基因的表达^[9]。

迄今为止已发现 Wnt 家族至少有 19 种成员,
Wnt10b 又名 Wnt12,被激活后导致小鼠乳腺肿瘤

的发生^[10],Wend P 等^[11]研究发现 Wnt10b 可以
通过活化 Wnt/β-catenin 通路引起 HMGA2 的表达
促进高侵袭性乳腺癌细胞的增殖,这就表明
Wnt10b 在促进肿瘤的发生发展方面具有重要作
用。我们从 mRNA 和蛋白 2 个层面检测 Wnt10b
在胃癌组织和癌旁组织的表达情况,结果表明
Wnt10b 在同一病人胃癌组织和癌旁组织的表达
具有明显的差异,这一研究结果与卵巢癌是一致
的^[12]。从临床资料的分析可以看到,Wnt10b 在肿
瘤组织的表达上调与淋巴结的转移具有相关性,这
可能与 Wnt10b 通过活化 Wnt/β-catenin 促进肿瘤
细胞 EMT 的改变,降低肿瘤细胞间黏附,加强肿
瘤细胞转移所引起的。肿瘤组织中 Wnt10b 可以
来源于肿瘤细胞,也可以来源于肿瘤微环境细胞^[13],
胃癌组织中 Wnt10b 的高表达是由于肿瘤
细胞自身还是由于肿瘤微环境细胞分泌所致,及其
作用机制还有待于进一步的探讨。总之,本文结果
表明胃癌组织 Wnt10b 的表达高于癌旁组织,并且
与淋巴结转移有相关性,为我们的理解胃癌的
发生发展具有指导意义,为胃癌的分子诊断和
靶向治疗提供实验依据。

参考文献:

- [1] 吴在德,吴肇汉,郑树,等. 外科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2004:460-465.
- [2] Wend P, Wend K, Krum SA, et al. The role of WNT10B in physiology and disease[J]. Acta Physiol(Oxf), 2012, 204(1): 34-51.
- [3] Benhaj K, Akcali KC, Ozturk M. Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines[J]. Oncol Rep, 2006, 15(3): 701-707.
- [4] Katoh M, Katoh M. AP1- and NF-kappa B-binding sites conserved among mammalian WNT10B orthologs elucidate the TNFalpha-WNT10B signaling loop implicated in carcinogenesis and adipogenesis[J]. Int J Mol Med, 2007, 19(4): 699-703.
- [5] Miranda-Carboni GA, Krum SA, Yee K, et al. A functional link between Wnt signaling and SKP2-independent p27 turnover in mammary tumors[J]. Genes Dev, 2008, 22(22): 3121-3134.
- [6] Fernandez-Cobo M, Zammarchi F, Mandeli J, et al. Expression of Wnt5A and Wnt10B in non-immortalized breast cancer cells[J]. Oncol Rep, 2007, 17(4): 903-907.
- [7] Mödder UI, Oursler MJ, Khosla S, et al. Wnt10b activates the Wnt, notch, and NFκB pathways in U2OS osteosarcoma cells[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(5): 1392-1402.

(下转第 36 页)

kle-brachial index to predict future cardiovascular outcomes: systematic review[J]. *Am J Hypertens*, 2013, 26(1):13-19.

- [5] Bonithon-Kopp C, Touboul PJ, Berr C, et al. Relation of intima-media thickness to atherosclerotic plaques in carotid arteries. The Vascular Aging (EVA) Study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(2):310-316.
- [6] Pedersen TR, Wilhelmsen L, Faergeman O, et al. Follow-up

study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study(4S) of cholesterol lowering[J]. *Am J Cardiol*, 2000, 86(3):257-262.

- [7] Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 2001, 104(3):365-372.

(收稿日期 2013-12-01)

(上接第 29 页)

然而对早期患者则非常困难;其次,作为前瞻性研究,对临床特征评价不够精确地;再次,收集的病例数偏少,分离组织中的 DNA 也是不完美,特别是存放已久的组织标本。因此,我们的数据的确认需要进一步验证,通过的多中心、大样本的测试方法。

通过检测 p14ARF 基因启动子甲基化在非小细胞肺癌肿瘤及癌旁组织中的表达情况,研究 p14ARF 启动子区甲基化在肺癌发生发展中的机制,我们认为检测 p14ARF 基因甲基化状态可作为肺癌早期诊断或判断预后的一个有价值的生物学标志。在将来的研究中,我们有可能寻找合适的去甲基化试剂,恢复抑癌基因的活性,为抗肿瘤治疗及基因干扰治疗提供一种思路和理论基础。

参考文献

- [1] Gatta G, Ciampichini R, Bisanti L, et al. Estimates of cancer burden in Lombardy[J]. *Tumori*, 2013, 99(3):277-284.
- [2] Wilson IM, Vucic EA, Enfield KS, et al. EYA4 is inactivated biallelically at a high frequency in sporadic lung cancer and is associated with familial lung cancer risk[J]. *Oncogene*, 2013, 10(7):1038.
- [3] Watanabe T, Nakamura M, Yonekawa Y, et al. Promoter hypermethylation and homozygous deletion of the p14ARF and p16INK4a genes in oligo dendroghomas[J]. *Acta Neuropathol*, 2001, 101(3):185-189.
- [4] Griffiths EA, Gore SD, Hooker CM, et al. Epigenetic differences in cytogenetically normal versus abnormal acute mye-

loid leukemia[J]. *Epigenetics*, 2010, 5(7):590-600.

- [5] Tam KW, Zhang W, Soh J, et al. CDKN2A/p16 Inactivation Mechanisms and Their Relationship to Smoke Exposure and Molecular Features in Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. *Thorac Oncol*, 2013, 8(11):1378-1388.
- [6] Esteller M, Tortola S, Toyota M, et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14 (ARF) is independent of p16 (INK4a) methylation and p53 mutational status[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(1):129-133.
- [7] Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, et al. Aberrant hypermethylation of p14ARF and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression [J]. *Brain Pathol*, 2007, 17(1):5-10.
- [8] Kim HJ, Kim MH, Song MH, Song DE, Yu E. Immunohistochemical study of p53 mutation and p16, p14 alterations encoded by INK4a-ARF in mucin-hypersecreting bile duct tumor [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2005, 45(3):189-194.
- [9] Takayama K, Inoue K, Tokunaga S, et al. A Phase II study of concurrent thoracic radiotherapy in combination with weekly paclitaxel plus carboplatin in locally advanced non-small cell lung cancer: LOGIK0401 [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72(6):1353-1359.
- [10] Sanchez-Cespedes M, Reed AL, Buta M, et al. Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 1999, 18(43):5843-5849.
- [11] Deng D, Liu Z, Du Y. Epigenetic alterations as cancer diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers [J]. *Adv Genet*, 2010, 71:125-176.

(收稿日期 2013-12-11)

(上接第 32 页)

- [8] Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(24):3286-3305.
- [9] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14:59-88.
- [10] Callahan R. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1996, 39(1):33-44.
- [11] Wend P, Runke S, Wend K, et al. WNT10B/ β -catenin signaling induces HMGA2 and proliferation in metastatic triple-negative breast cancer[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(2):264-

279.

- [12] Steg A, Wang W, Blanquicett C, et al. Multiple gene expression analyses in paraffin-embedded tissues by TaqMan low-density array: Application to hedgehog and Wnt pathway analysis in ovarian endometrioid adenocarcinoma[J]. *J Mol Diagn*, 2006, 8(1):76-83.
- [13] Aprelikova O, Palla J, Hibler B, et al. Silencing of miR-148a in cancer-associated fibroblasts results in WNT10B-mediated stimulation of tumor cell motility [J]. *Oncogene*, 2013, 32(27):3246-3253.

(收稿日期 2013-11-14)