

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.28.019

Wnt10b 在肝细胞肝癌中的表达*

浮凤洲¹, 范晓丽², 孙莉^{1,2△}

(桂林医学院临床; 1. 医学院; 2. 基础医学院, 广西桂林 541004)

摘要:目的 比较分析 Wnt10b 分别在肝细胞肝癌(简称肝癌)及对应癌旁组织中的表达水平,探讨 Wnt10b 与肝癌及其临床病理参数的相关性。方法 采用实时定量 PCR 和 Western blot 技术分别检测 33 例肝癌及其对应癌旁组织中 Wnt10b mRNA 及蛋白的表达。结果 Wnt10b mRNA 及蛋白在肝癌组织中表达量明显高于对应的癌旁组织($P < 0.05$)。结论 Wnt10b 在肝癌组织中表达上调,结合 Wnt 信号传导途径的功能,提示 Wnt10b 异常活化可能参与了肝癌的始动和发展过程。

关键词: Wnt10b; 癌, 肝细胞; 聚合酶链反应

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)28-3753-04

The expression of Wnt10b in hepatocellular carcinoma*

Fu Fengzhou¹, Fan Xiaoli², Sun Li^{1,2△}

(1. Clinical Medical College; 2. Basic Medical College, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541004, China)

Abstract: Objective To comparatively analyze the expression of Wnt10b in hepatocellular carcinoma tissues and para-carcinoma tissues, and discuss the correlation of Wnt10b with clinicopathological parameters of hepatocellular carcinoma. **Methods** Wnt10b mRNA and protein were respectively detected by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot in 33 cases of hepatocellular carcinoma and para-carcinoma tissues. **Results** Expression of Wnt10b mRNA and protein were significantly higher in hepatocellular cancer tissues than that in para-carcinoma tissues ($P < 0.05$). **Conclusion** Up-regulated expression of Wnt10b in hepatocellular tissues may be involved in Wnt signal transduction pathways in the development and progression of hepatocellular cancer.

Key words: Wnt10b, carcinoma; hepatocellular; polymerase chain reactions

肝细胞肝癌(以下简称肝癌)是我国最常见的恶性肿瘤之一,具有高发病率和高病死率的特点,近年来其发病率呈增高趋势。Wnt 通路由多种癌基因和抑癌基因编码的蛋白质组成,是一种与调节胚胎发育以及肿瘤发生发展相关的蛋白信号传导通路^[1]。Wnt 通路与肿瘤相关的研究已成为当前的研究热点。Wnt 信号通路中与 β -catenin 聚集密切相关的信号通路称为经典 Wnt 信号通路,除此以外的 Wnt 信号通路称为非经典 Wnt 信号通路。Wnt10b 是 Wnt 家族成员之一,由 2.2 kb 的 mRNA 编码的 389 个氨基酸构成,相对分子质量为 43×10^3 。研究证实 Wnt10b 通过经典途径在肿瘤发生发展中发挥作用,并且在体外肝癌细胞株的研究中发现 Wnt10b 高表达^[2]。本研究采用荧光定量 PCR 和 Western blot 技术分别检测 33 例肝癌组织及其对应癌旁组织中 Wnt10b mRNA 及蛋白的表达,初步探讨 Wnt10b 在肝癌中的表达规律及其与临床病理参数之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集 2012 年 6 月至 2013 年 5 月桂林医学院附属医院原发性肝细胞肝癌手术标本 33 对,按照 C1、N1、C2、N2……C32、N32、C33、N33 编号,C 代表癌组织,N 代表癌旁组织。所有入组患者术前均未经放化疗及其他抗癌治疗。

1.1.2 试剂 RNAiso 试剂、PrimeScript RT reagent Kit With

gDNA Eraser 试剂盒、SYBR Green PCR 试剂盒均购自大连 Takara 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自北京博奥森生物科技有限公司,鼠抗人单克隆抗体及羊抗鼠 IgG 购自美国 Aviva Systems Biology 公司, β -actin 鼠抗人单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。引物均由 Invitrogen 公司合成。Wnt10b 正向引物:5'-TTG ATA CCC ACA ACC GCA AT-3'; Wnt10b 反向引物:5'-GTG CTC GCT CAC AGA AGT CAG G-3', β -actin 正向引物:5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG T-3', β -actin 反向引物:5'-GGG ATA GCA CAG CCT GGA T-3'。

1.1.3 仪器 ABI 7500 FAST 荧光定量 PCR 扩增仪,美国 ABI 公司;紫外分光光度计,美国 ABI 公司;电泳转膜仪,北京六一仪器公司。

1.2 方法

1.2.1 分离肿瘤及癌旁组织 手术标本切除后立即取材,避开肿瘤坏死与出血部位,无菌条件下取肿瘤组织及癌旁组织(用工具尺测量距瘤块外缘 3 cm 以上)各 2 块,标本大小约 1 cm \times 1 cm \times 1 cm,一块置于甲醛固定液中固定,制做组织切片并进行苏木素-伊红(HE)染色,邀 2 名病理学专家对切片进行病理学鉴定,另一块在组织离体后 20 min 内置于液氮中速冻,然后储存于-80℃冰箱,用于 RNA 和蛋白提取。

1.2.2 总 RNA 和蛋白的提取 取冻存的组织标本,每例组织标本称取 100 mg 加入 1 mL RNAiso,在冰浴中进行匀浆处

* 基金项目:广西科学技术厅资助课题(桂科攻 12300017)。 作者简介:浮凤洲(1986—),住院医师,硕士,主要从事内科学研究。 △

理,直至匀浆液呈颗粒无透明状,向匀浆裂解液中加入 0.2 mL 的氯仿,盖紧离心管盖,用手猛烈振荡 15 s,待乳液充分乳化,充分相现象后,室温静置 5 min,然后 12 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min,取出分相清楚的离心管,转移上清液至新的离心管中,加入等体积的异丙醇,充分混匀,室温静置 10 min,12 000 r/min 4 ℃ 离心 10 min,有沉淀析出,弃上清液,75%乙醇洗涤沉淀后小心弃去乙醇,室温干燥沉淀 5 min,加入 0.04 mL 焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解沉淀。采用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的均一性和完整性,用紫外分光光度计测定总 RNA 的纯度和含量,A260/A280 在 1.8~2.0 之间时,读取 RNA 浓度。

1.2.3 cDNA 合成 按 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒说明书分两步进行 cDNA 合成,第一步:取总 RNA 3.0 μL,Oligo dT Primer 1.0 μL,dNTP mixture 1.0 μL,RNase free dH₂O 4.5 μL,反应条件为 42 ℃ 2 min;第二步:向第一步反应管中加 5×PrimeScript Buffer 4.0 μL,RNase Inhibitor 0.5 μL,PrimeScript RTase 1.0 μL,RNase Free dH₂O 4.5 μL,反应条件为 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。反应产物放于 -20 ℃ 冰箱保存。

1.2.4 荧光定量 PCR 采用 SYBR 法,使用 ABI 7500 Fast Real Time PCR System 进行 PCR 扩增和结果分析,反应体系:2×SYBR Premix Ex Taq™ II 10.0 μL,上、下游引物各 0.8 μL,50×ROX Reference Dye II 0.4 μL,cDNA 模板 2 μL,加去 RNase 水至 20 μL。两步法 PCR 扩增:95 ℃ 30 s;95 ℃ 3 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。每个样品均作复管反应,重复 3 次,以 DEPC 处理水作为阴性对照。所有样品均在相同反应条件下

进行 Wnt10b mRNA 检测。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对扩增产物定量计算, $\Delta CT = CT_{Wnt10b} - CT_{\beta-actin}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{癌} - \Delta CT_{癌旁} = (CT_{Wnt10b} - CT_{\beta-actin})_{癌} - (CT_{Wnt10b} - CT_{\beta-actin})_{癌旁}$ 。C 代表 Cycle(扩增循环数),T 代表 thresholds(扩增阈值),CT 值的含义是:每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。

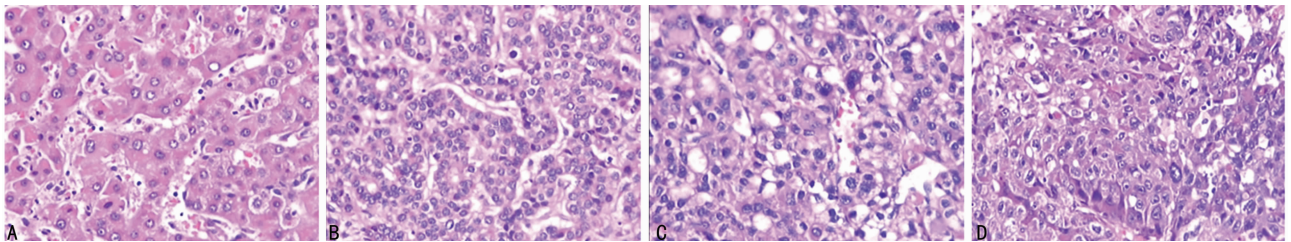
1.2.5 PCR 产物测序 在 CEQ8000 测序仪上进行 PCR 产物测序,以鉴定 PCR 产物特异性。

1.2.6 Western blot 检测 Wnt10b 蛋白的表达 分别提取肝癌和癌旁组织的总蛋白,经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转移电泳产物至硝酸纤维素膜上,于 5%脱脂奶粉中室温封闭 1.5 h。加一抗(鼠抗人 Wnt10b 单克隆抗体,1:1 500 稀释),置于 4 ℃ 冰箱反应过夜。TBST 洗涤 3 遍,每次 10 min,加二抗(羊抗鼠 IgG 抗体,1:1 000 稀释),室温培育 2 h,暗室发光。以鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(1:1 500 稀释)作为内参照,Wnt10b 蛋白的相对表达量以 Wnt10b/ β -actin 灰度值比表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行统计学处理,癌组织与癌旁组织比较采用配对 *t* 检验,Wnt10b mRNA 表达与临床病理参数间的比较采用两样本 *t* 检验,检验水准为 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色鉴定组织病理特征 共收集标本 33 对,通过 HE 染色,病理鉴定所有组织标本病理特征,高分化肝癌 7 对,中分化肝癌 17 对,低分化肝癌 9 对,见图 1。



A:癌旁组织;B:高分化肝癌组织;C:中分化肝癌组织;D:低分化肝癌组织。

图 1 癌及癌旁组织病理学图片(HE×200)

2.2 组织总 RNA 提取及实时定量 PCR 采用 Trizol 法提取组织总 RNA,取产物 5 μL 上样量于 1.2%琼脂糖凝胶电泳,电泳结果可见 18S 和 28S 两条清晰条带,提示总 RNA 高质量提取成功。将 RNA 反转录后进行荧光定量 PCR 检测,通过荧光定量 PCR 扩增曲线,产物到达平台期,对融解曲线分析,可以看到单一的峰型,说明扩增产物有较高的特异性。PCR 产物比较采用 CT 法定量,根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值反映出 Wnt10b 在不同样本的表达水平,见图 2。

2.3 Wnt10b mRNA 在肝癌及癌旁组织中的表达差异 将每个样品的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值作为观察值,反映 Wnt10b mRNA 在 33 对肝癌组织标本中的表达量,对 Wnt10b mRNA 在肝癌和癌旁组织中的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行配对 *t* 检验,结果显示:Wnt10b mRNA 在肝癌组织中的表达量显著高于癌旁组织,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。

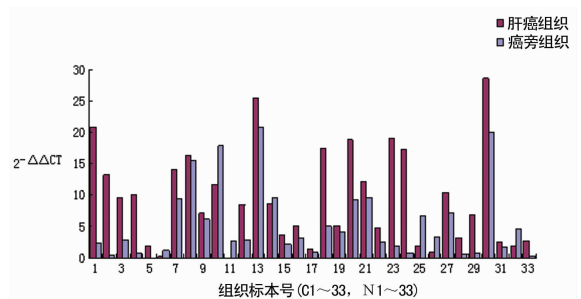


图 2 Wnt10b mRNA 在肝癌及癌旁组织中的表达

2.4 Wnt10b 蛋白在肝癌及癌旁组织中的表达差异 Western blot 结果显示:肝癌组织中 Wnt10b 蛋白表达水平明显高于癌旁组织,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。Wnt10b 和 β -actin 灰度值见图 3。

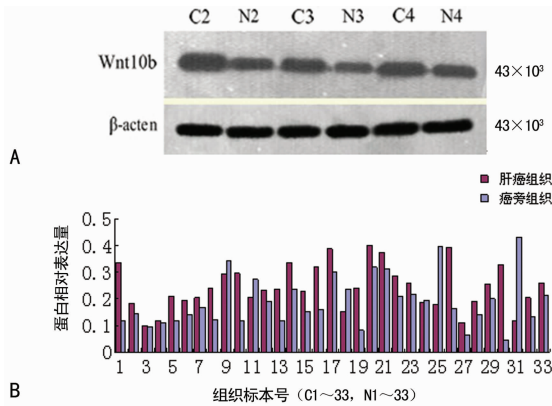
2.5 肝癌组织中 Wnt10b mRNA 的表达与临床病理参数的关

系 肝癌组织中 Wnt10b mRNA 的表达与患者的年龄、性别、组织分化程度及临床分期无关($P>0.05$),见表 3。

表 2 癌组织和癌旁组织中 Wnt10b mRNA 和蛋白的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	mRNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值	蛋白质
癌组织	33	9.444 1 \pm 7.678 7 ^a	0.243 9 \pm 0.082 6 ^a
癌旁组织	33	5.354 7 \pm 5.790 5	0.190 3 \pm 0.093 6

^a: $P<0.01$,与癌旁组织比较。



A: Western blot 检测 Wnt10b 蛋白表达; B: Western blot 分析图。

图 3 Western blot 检测 Wnt10b 在肝癌及癌旁组织中蛋白的表达

表 3 组织中 Wnt10b 的表达与临床病理参数的比较($\bar{x}\pm s$)

项目	n	Wnt10b mRNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值	P
性别			0.670 3
男	22	9.032 5 \pm 7.734 8	
女	11	10.267 2 \pm 7.869 3	
年龄			0.946 5
<60 岁	20	9.518 1 \pm 8.565 6	
\geq 60 岁	13	9.330 1 \pm 6.406 4	
分化程度			
高	7	8.966 8 \pm 8.544 2	0.973 0(P1)
中	17	9.094 1 \pm 8.176 6	0.668 5(P2)
低	9	10.476 3 \pm 6.762 3	0.698 6(P3)
临床分期			
II	10	8.378 9 \pm 5.866 2	0.567 9(P4)
III	15	10.281 7 \pm 8.181 0	0.720 7(P5)
IV	8	9.039 8 \pm 8.741 3	0.857 2(P6)

P1: 高分化组和中分化组比较; P2: 中分化组和低分化组比较; P3 高分化组和低分化组比较; P4: II 期和 III 期比较; P5: III 期和 IV 期比较; P6: II 期和 IV 期比较。

3 讨 论

Wnt 经典信号通路在调节组织器官的生成、增殖和分化, 以及维持机体稳态中起重要作用^[3]。经典 Wnt 信号通路的构成和激活机制的研究已相对完善, 人们认识到经典 Wnt 信号通路并不是一条单纯的线性信号传导通路, 而是一条多基因

参与, 拥有多个作用位点的相对开放的信号途径, 参与该途径的蛋白及其作用机制相对复杂。Wnt 蛋白是 Wnt 基因编码的分泌性蛋白, 属于经典途径的有: Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt3a、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10a、Wnt10b^[2]。之前的研究表明 Wnt 经典信号通路参与了消化系统肿瘤和女性生殖系统肿瘤的形成。研究证实, Wnt2 在食管细胞癌中通过激活经典信号通路, 促进食管癌细胞的生长^[4]; 据报道, Wnt1^[5]、Wnt2^[6] 在胃癌组织中异常表达。赵玉洁等^[7] 研究发现 Wnt3a 在正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变组织及宫颈鳞癌组织中的表达逐渐升高, 可能参与了宫颈鳞状上皮的恶性转化过程, 促进宫颈上皮内瘤变向宫颈鳞癌转化。另研究发现, Wnt10a 高表达时, 肾癌细胞株的 β 连环蛋白(β -catenin) 聚集、细胞周期素 D1(cyclin D1) 与禽类髓细胞病毒致癌基因同系物(c-myc) 表达增加^[8], 而当 Wnt10b 的表达被抑制后, 细胞内的 β -catenin 聚集减少, cyclin D1 与 c-myc 表达下降, 同时也导致细胞增殖、迁移、侵袭力等下降^[9]。

研究表明, Wnt 经典信号通路各蛋白表达水平的改变及相关基因的突变参与了原发性肝癌的发生发展^[10-12]。30%~70% 的肝癌中发现 Wnt 经典通路关键因子 β -catenin 在胞内聚集^[13]。Wei 等^[14] 发现 Wnt1 在肝癌组织及其细胞系中表达增高, Wnt1 蛋白抗体能够降低肝癌细胞系 Huh7 和 Hep40 的增生及生存能力, 诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制经典 Wnt 信号通路, 而对正常肝细胞生长无影响。同样有研究认为 Wnt1 可以作为一个重要指标预测肝癌术后复发^[15]。Yoshikawa 等^[16] 发现 7/10 的肝癌和 1/2 的结肠癌细胞株表达大量的 Wnt10b mRNA。Yuzugullu 等^[2] 研究发现在高分化和低分化的 11 种肝癌细胞系中 Wnt3 和 Wnt10b 均表达上调。因此, Wnt10b 的异常表达参与了肝癌的发生, 可能扮演着一个重要角色。本文从临床肝癌组织着手, 运用荧光定量 PCR 技术和 Western blot 技术, 对肝癌组织中 Wnt10b 基因转录和蛋白水平进行相对准确的定量检测和分析, 敏感性和特异性较高。通过分析肝癌组织和癌旁组织中 Wnt10b 基因和蛋白的表达变化规律, 以研究 Wnt10b 在肝癌发生发展中的作用。

研究结果显示, Wnt10b mRNA 及蛋白在肝癌组织中表达水平高于癌旁组织, 研究结果与 Yuzugullu 等^[2] 的一致, 由结果可见 Wnt10b 基因和蛋白表达趋势呈现出一致性, 作者分析 Wnt10b 表达的上调可能是在基因转录水平, 而 Wnt10b 在肝癌组织的异常高表达提示, Wnt10b 可能在肝癌的发生发展过程中发挥着癌基因样的作用, 在正常肝细胞向癌细胞转化过程中起着正向促进作用, 而非抑制作用。而 Wnt10b mRNA 和蛋白的表达与患者的性别、年龄、肿瘤分化程度及临床分期无关, 作者分析可能存在以下 4 方面原因: (1) 样本含量小、存在样本选择偏倚和信息偏倚; (2) 以及 RT-PCR 和 Western blot 结果出现假阳性; (3) 人体组织中基因和蛋白表达的个体差异比较大; (4) 肝癌的发生发展是一系列基因和蛋白的参与, 存在着多种信息传导通路异常传导的病理过程, Wnt10b 对于肝癌不是一个绝对独立的因素, 只是整个肝癌信号网络中的一个点。根据 Wnt 信号通路的传导机制, Wnt10b 在整个 Wnt 信号通路传导过程中的启动阶段发挥重要作用, 从 Wnt10b 的异常表达达到一系列靶基因的激活则可能受多种因子和信号通路的调节, 而非简单的线性传导。作者认为, 进一步研究 Wnt10b 下游靶

基因的作用机制, 探明 Wnt10b 介导的整条 Wnt 信号通路中的各个环节以及寻找通路中抑制肿瘤细胞增殖的关键靶点十分重要。故本课题下一阶段将进行 Wnt10b 在肝癌中下游靶基因的作用机制的研究, 以及利用构建慢病毒载体和基因干扰技术探讨 Wnt10b 基因沉默后对肝癌细胞株的影响。

参考文献:

- [1] Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(1):11-26.
 - [2] Yuzugullu H, Benhaj K, Ozturk N, et al. Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Mol Cancer*, 2009, 8:90.
 - [3] Yang YZ. Wnt signaling in development and disease [J]. *Cell Biosci*, 2012, 2(1):14.
 - [4] Fu L, Zhang C, Zhang LY, et al. Wnt2 secreted by tumour fibroblasts promotes tumour progression in oesophageal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway [J]. *Gut*, 2011, 60(12):1635-1643.
 - [5] 刘灿均, 蔡圣强, 车彦军. Wnt-1 和 PAR-1 在胃癌中的表达及其病理特征的相关性研究 [J]. *实用临床医药杂志*, 2011, 15(15):3-6.
 - [6] 冯红, 梁春华, 王建敏, 等. 胃癌发生发展中 β -连环蛋白异常表达与 Wnt 传导通路激活的关系 [J]. *中国全科医学*, 2009, 12(14):1265-1267.
 - [7] 赵玉洁, 胡建鹏, 章一涓. Wnt-3a 和 β -catenin 在宫颈上皮内瘤变及宫颈鳞癌中的表达及意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(12):1457-1460.
 - [8] Hakim SG, Kosmehl H, Sieg P, et al. Altered expression of cell-cell adhesion molecules β -catenin/E-cadherin and related Wnt-signaling pathway in sporadic and syndromal keratocystic odontogenic tumors [J]. *Clin Oral Investig*, 2011, 15(3):321-328.
 - [9] Galbraith RL, Poole EM, Duggan D, et al. Polymorphisms in WNT6 and WNT10A and colorectal adenoma risk [J]. *Nutr Cancer*, 2011, 63(4):558-564.
 - [10] Mukherjee N, Bhattacharya N, Alam N, et al. Subtype-specific alterations of the Wnt signaling pathway in breast cancer: clinical and prognostic significance [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(2):210-220.
 - [11] Syed Sameer A, Shah ZA, Abdullah S, et al. Analysis of molecular aberrations of Wnt pathway gliadators in colorectal cancer in the Kashmiri population [J]. *Hum Genomics*, 2011, 5(5):441-452.
 - [12] Pacheco-Pinedo EC, Morrisey EE. Wnt and Kras signaling-dark siblings in lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2011, 2(7):569-574.
 - [13] Lee HC, Kim M, Wands JR. Wnt/frizzled signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Biosci*, 2006, 11:1901-1915.
 - [14] Wei W, Chua MS, Grepper S, et al. Blockade of Wnt-1 signaling leads to anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Mol Cancer*, 2009, 8:76.
 - [15] Lee HH, Uen YH, Tian YF, et al. Wnt-1 protein as a prognostic biomarker for hepatitis B-related and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma after surgery [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(5):1562-1569.
 - [16] Yoshikawa H, Matsubara K, Zhou XA, et al. WNT10B functional dualism: β -Catenin/Tcf-dependent growth promotion or Independent suppression with deregulated expression in cancer [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(11):4292-4303.
- (收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-06-22)
-
- (上接第 3715 页)
- therapy: a Radiation Therapy Oncology Group consensus panel Atlas [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 83(3):e353-e362.
- [10] Mundt AJ, Roeske JC, Lujan AE, et al. Initial clinical experience with intensity-modulated whole-pelvis radiation therapy in women with gynecologic malignancies [J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 82(3):456-463.
 - [11] Mell LK, Kochanski JD, Roeske JC, et al. Dosimetric predictors of acute hematologic toxicity in cervical cancer patients treated with concurrent cisplatin and intensity-modulated pelvic radiotherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 66(5):1356-1365.
 - [12] Rose BS, Aydogan B. Normal tissue complication probability modeling of acute hematologic toxicity in cervical cancer patients treated with chemoradiotherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 79(3):800-807.
 - [13] Albuquerque K, Giangreco D, Morrison CA, et al. Radiation-related predictors of hematologic toxicity after concurrent chemoradiation for cervical cancer and implications for bone marrow-sparing pelvic IMRT [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 79(4):1043-1047.
 - [14] Mahantshetty U, Krishnatry R, Chaudhari SA, et al. Comparison of 2 contouring methods of bone marrow on CT and correlation with hematological toxicities in non-bone marrow-sparing pelvic intensity-modulated radiotherapy with concurrent cisplatin for cervical cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2012, 22(8):1427-1434.
- (收稿日期:2014-05-15 修回日期:2014-06-10)