

Wnt 信号通路及靶基因在非小细胞肺癌组织中的表达

韩竞春 于 剑 俞红女 姜 媛 曹秋婷

摘 要 **目的** 研究 Wnt 信号通路中 β -catenin、TCF-4 和 Wnt-2 在非小细胞肺癌中的活化状态及其与靶基因 VEGF 和 Survivin 表达的相关性,探讨 Wnt 信号通路对非小细胞肺癌细胞增殖、侵袭转移以及对靶基因表达的影响,为非小细胞肺癌多靶点基因治疗提供实验依据。**方法** 应用 RT-PCR、免疫组化和 Western blot 等方法,检测非小细胞肺癌的癌组织及癌旁正常组织中 β -catenin、TCF-4 和 Wnt-2 的表达,以及在 Wnt 信号通路的活化状态下靶基因 VEGF 和 Survivin 表达情况。**结果** 在非小细胞肺癌组织中, β -catenin、TCF-4 和 Wnt-2 的表达明显高于癌旁正常组织($P < 0.01$);Wnt⁻组与 Wnt⁺组在癌旁正常组织和 NSCLC 组织中分布差异具有统计学意义($P = 0.000$);VEGF 和 Survivin 在 Wnt⁺组中的表达频率均明显高于 Wnt⁻组。**结论** 非小细胞肺癌组织中 Wnt 信号通路被活化,其通路活化可能是导致非小细胞肺癌各靶基因表达增加的重要因素,并与非小细胞肺癌的发生、发展密切相关。

关键词 Wnt 信号通路 靶基因 VEGF Survivin 非小细胞肺癌

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.027

Expression of Wnt Signaling Pathway and Its Target Protein in NSCLC Tissue. Han Jingchun, Yu Jian, Yu Hongnü, et al. Department of Oncology, The Xinhua Hospital Affiliated to Dalian University, Liaoning 116021 China

Abstract Objective To study the correlation between the status of the activation of Wnt-2 and β -catenin/TCF-4 and the expression of its target protein VEGF and Survivin, to discuss the influence of the expression of Wnt signaling pathway to the proliferation and apoptosis of NSCLC cells. **Methods** Immunohistochemistry, RT-PCR and western blotting were used to detect Wnt signaling activation and its correlation of its target protein expression in NSCLC tissue, adjacent tissue and normal tissue. **Results** Expressions of Wnt-2, β -catenin and TCF-4 were significantly higher in cancer tissues compared with normal tissues ($P < 0.01$). The distribution of Wnt⁺ and Wnt⁻ group in normal and cancerous tissues were significantly different ($P = 0.000$). In Wnt⁺ group, the expression of VEGF and Survivin were significantly higher than the Wnt⁻ group. **Conclusion** Wnt signaling activation maybe a major factor of the expression the target protein which plays a important role in carcinogenesis of NSCLC.

Key words Wnt signaling; Target gene; VEGF; Survivin; NSCLC

肺癌死亡占癌症死因的首位,威胁着人类的生命和健康,肺癌中非小细胞肺癌(NSCLC)占比达到80%以上。研究显示,许多生命过程受 Wnt 信号通路控制,各种肿瘤,如肝癌、胃癌、乳腺癌及大肠癌等的发生发展均与此有关^[1-5]。核内转录因子 TCF-4 可携带上游信号分子 β -catenin 入核,启动 C-myc、Survivin、VEGF 等下游靶基因转录^[6]。Survivin 是迄今发现的最强的凋亡抑制因子;VEGF 是作用最强的促血管形成因子,参与多种肿瘤的生长和转移,如肿瘤组织中高表达,则被认为预后差^[7]。Wnt 信号通路成员蛋白中存在许多具有抑制肿瘤作用的负性调节因子,故负性调节因子是抗肿瘤的靶点。本课题组已

经结题了“Wnt 信号通路在非小细胞肺癌组织中的活化”^[8]和“Wnt 信号途径在胃癌组织和细胞系中的活化”^[9]的研究,本研究则在此基础上探讨非小细胞肺癌组织中 Wnt 信号通路(β -catenin、TCF-4 和 Wnt-2)总体水平的活化状态与靶基因 VEGF 和 Survivin 表达的相关性,为非小细胞肺癌多靶点基因治疗提供实验依据。

材料与方法

1. 标本:非小细胞肺癌 45 例,癌旁正常组织(距离肿瘤切缘 5cm)10 例,均来源于 2009~2011 年大连医科大学附属第一医院手术标本,术前均未行放疗或免疫治疗,并且病理诊断明确;标本在切除后 20min 内液氮速冻,-80℃低温冰箱保存备用。其中,女性 25 例,男性 20 例;腺癌 27 例,鳞癌 18 例;高分化 30 例,低分化 15 例;淋巴结转移 10 例,无淋巴结转移 35 例。

基金项目:大连市医药卫生科学研究计划项目(200978)

作者单位:116021 大连大学附属新华医院肿瘤科

通讯作者:韩竞春,电子信箱:hanjingchun0411@163.com

2. 方法: Santa Cruz(Santa Cruz, CA, USA) 公司提供各种抗体, 如兔多克隆 TCF - 4 抗体, 兔多克隆 VEGF 抗体, 兔多克隆 Survivin 抗体, 鼠单克隆 β - catenin 抗体, 羊多克隆 Wnt - 2 抗体等。免疫组化试剂盒: 北京中山生物技术有限公司的 SP - 9000(通用 SP Kit)、HistostainTM - plus Kits SP - 9003(山羊 SP Kit)。RT - PCR 分析: 常规提取总 RNA, PCR 引物序列(TaKaRa 生物工程有限公司) 见参考文献[10 ~ 13], 按照试剂盒(TaKaRa RNA LA PCRTM Kit) 的说明书操作 RNA 的反转录。免疫组化染色: 根据 SP 试剂盒说明行免疫组化染色, 按参考文献[7] 判定结果; 根据参考文献[14] 行 Western blot 法检测分析。

3. 统计学方法: 应用 SPSS 19.0 软件行统计学分

析, 数据分析采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法, 以及 Spearman 等级相关分析等进行处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. β - catenin 、TCF - 4 和 Wnt - 2 在不同病变肺组织中的表达^[8]: β - catenin 在癌旁组织表达率为 20%, 在肺癌组织中的阳性表达率为 75.6%; TCF - 4 在癌旁组织表达率为 0, 在肺癌组织中的阳性表达率为 80%; Wnt - 2 在癌旁组织表达率为 30%, 在肺癌组织中的阳性表达率为 64.4%(表 1)。免疫组化法检测结果显示, 在鳞癌、腺癌组织中 β - catenin 、TCF - 4 和 Wnt - 2 的表达阳性, 与癌旁组织相比差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图 1)。

表 1 β - catenin 、TCF - 4 和 Wnt - 2 在 NSCLC 组织和癌旁正常组织中的表达

不同组织	n	Wnt - 2				β - catenin				TCF - 4			
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
肺癌	45	29	16	3.990	0.046	34	11	11.168	0.001	36	9	19.75	0.000
癌旁组织	10	3	7			2	8			0	10		

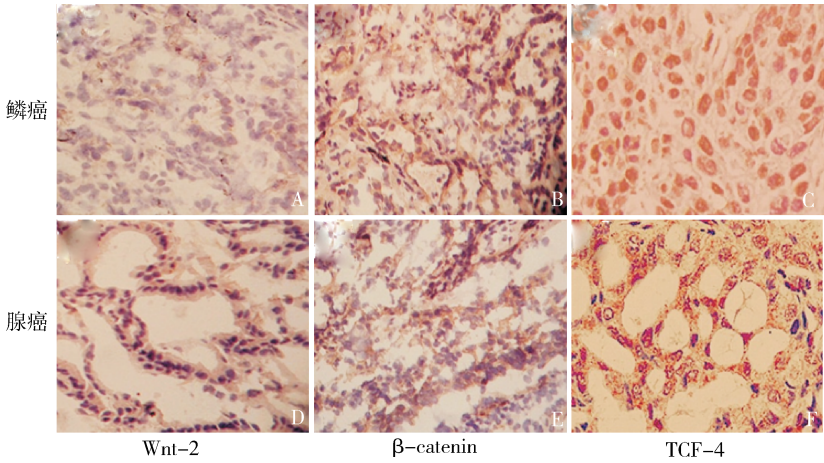


图 1 β - catenin 、TCF - 4 和 Wnt - 2 在肺癌组织中的免疫组化染色

2. VEGF 与 Survivin 在非小细胞肺癌组织和癌旁正常组织中的表达: VEGF 在癌旁组织表达率为 30%, 在肺癌组织中的阳性表达为 68.9%; Survivin 在癌旁组织表达率为 20%, 在肺癌组织中的阳性表

表 2 VEGF 与 Survivin 在非小细胞肺癌组织和癌旁正常组织中的表达

不同组织	n	VEGF				Survivin			
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
肺癌	45	31	14			29	16		
癌旁组织	10	3	7	5.242	0.022	2	8	6.571	0.010

达为 64.4%; 与癌旁组织相比, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表 2)。免疫组化法检测结果显示, 鳞癌、腺癌组织中靶基因 VEGF 和 Survivin 表达阳性(图 2)。

3. Wnt 信号通路活化状态的分布及其与靶基因表达的相关性: 同一样本中 β - catenin 、TCF - 4 和 Wnt - 2 不能同时阳性表达被称为 Wnt 信号通路非活化状态(Wnt^-); 而同一样本中上述 3 个关键环节同时表达, 则为 Wnt 信号通路活化(Wnt^+); 将此实验的全部样本分为 Wnt^- 组和 Wnt^+ 组, 不同病变肺组

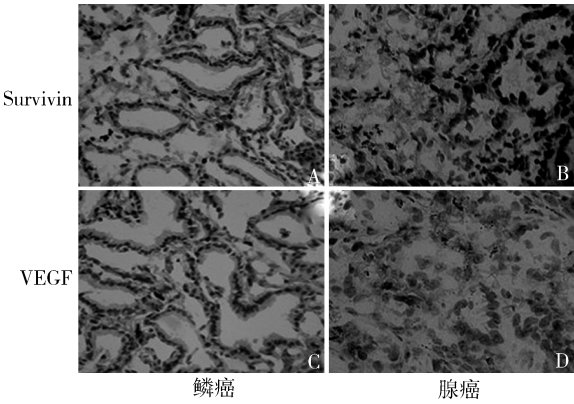


图2 VEGF、Survivin 在肺癌组织中的免疫组化染色

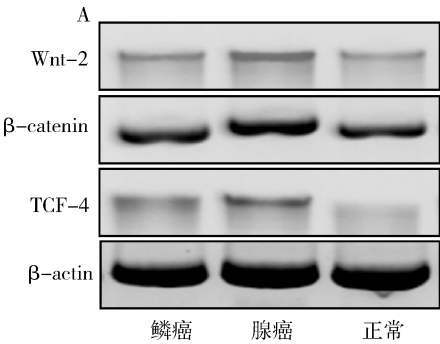
织中的分布(表3)如下:Wnt⁻组的25例中,癌旁正常组织10例,肺癌组织15例;Wnt⁺组中的30例则全部为肺癌组织;两者间的分布比例差异具有统计学意义($P < 0.05$)^[8]。VEGF和Survivin在Wnt⁺组中的表达频率明显高于Wnt⁻组,提示Wnt⁺可调控靶基因VEGF和Survivin的表达(表4)。

表3 Wnt 信号通路活化状态在不同病变肺组织中的分布情况

分组	n	肺癌组织	癌旁组织	P
Wnt ⁺	30	30	0	0.001
Wnt ⁻	25	15	10	

表4 Wnt 途径活化与靶基因表达相关性分析

靶基因		Wnt ⁻	Wnt ⁺
VEGF	-	14	1
	+	7	8
	> ++	4	21
Z/P		4.548/0.000	
Survivin	-	10	0
	+	3	2
	> ++	12	28
Z/P		3.834/0.000	



4. 不同病变肺组织中 β - catenin 、TCF - 4 和 Wnt - 2 的表达情况:为明确不同病变肺组织中 Wnt 信号通路的活化状态,采用 Western blot 法(图3A)和 RT - PCR(图3B)方法检测鳞癌、腺癌和癌旁正常肺组织中 β - catenin 、TCF - 4 和 Wnt - 2 蛋白及 mRNA 的表达情况。如图3所示,在鳞癌、腺癌组织中 β - catenin 、TCF - 4 和 Wnt - 2 蛋白和 mRNA 表达均高于癌旁正常肺组织,这与上述免疫组化数据相符,说明肺癌组织中 Wnt 信号通路被活化,提示 Wnt 通路相关因子与肿瘤的发生、发展密切相关。

5. 不同病变肺组织中靶基因 VEGF 和 Survivin 的表达情况:为进一步明确不同病变肺组织中靶基因 VEGF 和 Survivin 的表达情况,利用 Western blot 法(图4A)和 RT - PCR 法(图4B)检测鳞癌、腺癌和正常肺组织中靶基因 VEGF 和 Survivin 的蛋白及 mRNA 的表达。如图4所示,在正常组织中 VEGF 和 Survivin 蛋白及 mRNA 仅微弱表达或不表达,在鳞癌、腺癌组织中 VEGF 和 Survivin 蛋白及 mRNA 表达均明显增加,说明在非小细胞肺癌组织中 VEGF 和 Survivin 阳性表达,提示 VEGF 和 Survivin 与肿瘤的发生、发展密切相关。

讨 论

近年来,随着对肿瘤研究的深入,Wnt 信号通路在分子生物学、细胞生物学和肿瘤学等领域逐渐取得突破性的进展。Wnt 信号通路是一条较为复杂且保守的信号转导通路,在胚胎发育,调节细胞生长、分化以及肿瘤的发生、发展、迁移等生命活动中发挥重要作用^[15]。多种相关蛋白调节着 Wnt 信号通路的活性,其中 β - catenin 与 LEF/TCF 家族成员复合体是 Wnt 信号转导通路的关键环节^[9]。Wnt 信号异常活化是指 Wnt 激活了散乱蛋白,转导细胞内的信号, β - catenin 被活化的散乱蛋白抑制,并与 Axin - APC - GSK - 3 β 形成复合物,与 TCF/LEF 相结合,下

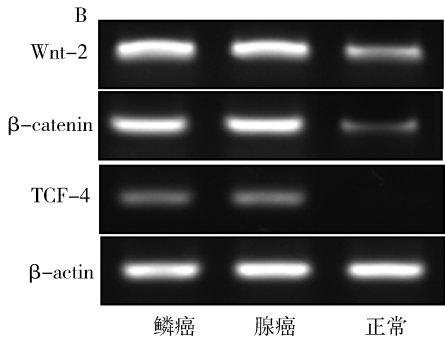


图3 检测 β - catenin 、TCF - 4 和 Wnt - 2 蛋白和 mRNA 表达情况

A. 蛋白;B. mRNA

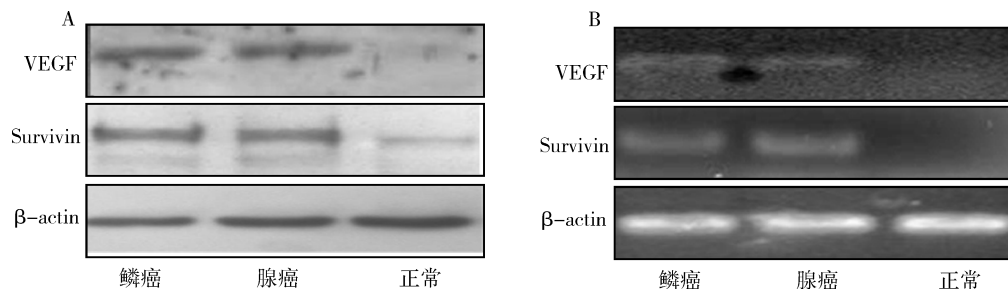


图 4 检测 VEGF、Survivin 蛋白和 mRNA 表达情况

A. 蛋白; B. mRNA

游靶基因 MMP-7、C-myc 等的转录受到刺激后引起细胞增生^[16-18]。Wnt 信号通路的异常活化与细胞恶性转变和肿瘤发生密切相关。综上所述,Wnt 信号通路的核心是 β -catenin 在细胞内累积,通过其下游途径引起特异靶基因的转录。结直肠癌、胃癌等消化道肿瘤中,Wnt 途径活化状态的研究比较成熟;NSCLC 组织中 Wnt 传导通路活化状态与不同病理类型肺组织的相关性以及和肺癌靶基因表达相互关系的研究罕有报道。

本实验结果显示,Wnt 信号通路中的 β -catenin、TCF-4 和 Wnt-2 在非小细胞肺癌组织中表达明显升高,说明这些 Wnt 信号通路相关因子参与非小细胞肺癌的发生和发展。进一步分析显示,在肺癌组织中 β -catenin、TCF-4 和 Wnt-2 3 个因子多数同时表达,Wnt 通路大多呈活化状态;在癌旁正常组织中,虽然存在 β -catenin、TCF-4 和 Wnt-2 中部分因子的表达,即或 β -catenin、TCF-4 和 Wnt-2 的表达,但并非同时表达,所以,Wnt 信号通路在癌旁组织中未活化,这提示在肺癌的发生、发展中,Wnt 信号通路的活化状态至关重要;肺癌相关靶基因的表达可能被活化的 Wnt 信号途径所诱导。

人类多种肿瘤中都存在 Wnt 途径的异常活化,Wnt 信号通路在胚胎发育过程中具有重要的调节作用,促进细胞发育并调节生长^[19]。Wnt 信号通路的活化状态与下游靶基因状态的改变有关,可能导致肺癌的发生和发展^[8]。目前罕有报道在肺癌组织中 Wnt 转导通路的活化状态与下游靶基因表达的相关性分析研究。本实验结果显示,VEGF 和 Survivin 在不同病变肺组织中表达程度明显不同,在癌组织中表达频率相对较高,在癌旁正常组织中表达频率较低;在分析 VEGF 和 Survivin 的表达规律时,笔者发现它们有着一个共同的特点,即均为 Wnt 信号通路的下游基因。表 4 显示,比较 Wnt 信号通路的活化状态,

Wnt⁺ 组的靶基因表达率明显高于 Wnt⁻ 组,提示 Wnt 信号通路的活化状态与靶基因的表达息息相关。故本研究结果显示,NSCLC 组织中各靶基因的表达可能由 Wnt 信号通路的活化所导致;在 NSCLC 组织中,靶基因的表达受到 Wnt 信号通路活化状态的调节;而癌旁组织中,靶基因的表达与 Wnt 信号通路的活化状态并不完全一致(表 4);故靶基因表达的调节作用可能并非由 Wnt 信号通路活化状态作为唯一的调节因素。为此,Wnt 信号通路的活化状态与 NSCLC 的生物学特性及靶基因表达的功能性分析的相互关系,尚需进一步探索与研究。

参考文献

- 1 Koziński K,Dobrzyń A. Wnt signaling pathway - its role in regulation of cell metabolism [J]. Postępy Hig Med Dosw,2013,26(67):1098-1108
- 2 Wands JR, Kim M. WNT/ β -catenin signaling and hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology,2014,60(2):452-454
- 3 Hidaka Y,Mitomi H,Saito T, et al. Alteration in the Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric neoplasias of fundic gland (chief cell predominant) type [J]. Hum Pathol,2013,44(11):2438-2448
- 4 Jiang G,Xiao X,Zeng Y, et al. Targeting beta-catenin signaling to induce apoptosis in human breast cancer cells by z-guggulsterone and guggulipid extract of ayurvedic medicine plant commiphora mukul [J]. BMC Complement Altern Med,2013,3(13):203-214
- 5 Herbst A,Jurinovic V,Krebs S, et al. Comprehensive analysis of β -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ β -catenin signaling [J]. BMC Genomics,2014,28(15):74-88
- 6 Kirikoshi H,Katoh M. Expression of Wnt7A in human normal tissue and cancer, and regulation of Wnt7A and Wnt7B in human cancer [J]. Int J Oncol,2002,21:895-900
- 7 Wang Q, Li H, Wang XW, et al. Resveratrol promotes differentiation and induces Fas-independent apoptosis of medulloblastoma cells [J]. Neurosci Lett, 2003, 351: 83-86
- 8 韩竞春,赵燕林,李川. Wnt 信号通路在非小细胞肺癌组织中的活化 [J]. 临床军医杂志,2012,40(2):373-375
- 9 韩竞春,黄磊,张开立,等. Wnt 信号通路在胃癌组织和细胞系中

- 的活化[J]. 临床军医杂志, 2008, 36(1): 7-9
- 10 Araki Y, Okamura S, Hussain SP, *et al.* Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the wnt and ras pathways[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 728-734
 - 11 Katoh M. Frequent up-regulation of WNT2 in primary gastric cancer and colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2001, 19: 1003-1007
 - 12 Ebert MP, Fei G, Kahmann S, *et al.* Increased beta-catenin mRNA levels and mutational alterations of the APC and beta-catenin gene are present in intestinal-type gastric cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23: 87-91
 - 13 Poser I, Golob M, Weidner M, *et al.* Down-regulation of COOH-terminal binding protein expression in malignant melanoma leads to induction of MIA expression[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 5962-5966
 - 14 Li H, Chen XY, Kong QY, *et al.* Cytopathological evaluations combined RNA and protein analyses on defined cell regions using single frozen tissue block[J]. *Cell Res*, 2002, 12: 117-121
 - 15 Sokol SY. Spatial and temporal aspects of Wnt signaling and planar cell polarity during vertebrate embryonic development[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 5(2): 78-85
 - 16 Serafino A, Moroni N, Zonfrillo M, *et al.* WNT-pathway components as predictive markers useful for diagnosis, prevention and therapy in inflammatory bowel disease and sporadic colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(4): 978-992
 - 17 Wang B, Li H, Liu Y, *et al.* Expression patterns of WNT/ β -CATENIN signaling molecules during human tooth development[J]. *J Mol Histol*, 2014, 45(5): 487-496
 - 18 Brutigam C, Raggioli A, Winter J. The Wnt/ β -catenin pathway regulates the expression of the miR-302 cluster in mouse ESCs and P19 cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75315-27
 - 19 韩竞春, 李川, 赵燕林. Wnt 信号通路与肺癌[J]. 临床军医杂志, 2010, 10(38): 857-859 (收稿日期: 2015-12-14)
(修回日期: 2015-12-24)

对氧磷酶 1 和脂蛋白磷脂酶 A₂ 与冠心病的相关性

孙 姬 郭玲玉 张明亮 陈一竹 张田田 张俊峰

摘 要 目的 探讨冠心病患者血清对氧磷酶 1(PON1)与脂蛋白磷脂酶 A₂(LP-PLA₂)活性与冠脉病变支数及斑块稳定性的相关性。**方法** 入选 88 例冠心病患者为研究组,同期行冠状动脉造影术(CAG)排除冠心病的 32 例患者为对照组。检测两组患者血清 PON1、LP-PLA₂ 活性,对 PON1、LP-PLA₂ 活性与冠状动脉病变支数及斑块稳定性进行相关性分析。**结果** 冠心病患者血清 PON1 活性明显低于对照组($P < 0.05$);活性均值随冠状动脉病变支数增加而降低($P < 0.05$);在斑块不稳定组 PON1 活性明显低于斑块稳定组($P < 0.05$)。冠心病患者血清 LP-PLA₂ 活性均值明显高于对照组($P < 0.05$),随冠状动脉病变支数增加而升高($P < 0.05$),且与患者总胆固醇、低密度脂蛋白水平呈正相关。**结论** 血清 PON1 及 LP-PLA₂ 活性与冠心病的发生及冠状动脉病变支数有相关性,PON1 活性降低可作为冠状动脉斑块趋于不稳定的观察指标。

关键词 对氧磷酶 1 脂蛋白磷脂酶 A₂ 冠心病

中图分类号 R541

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.028

Studies on Association of PON1 and LP-PLA₂ in Coronary Heart Disease. Sun Ji, Guo Lingyu, Zhang Mingliang, *et al.* Department of Cardiovascular Medicine, The Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

Abstract Objective To study the relationship between serum PON1 and LP-PLA₂ activity of coronary artery lesions and plaque stability in patients with coronary heart disease. **Methods** According to the coronary angiography results, the patients were divided into coronary heart disease group($n = 88$) and control($n = 32$). Serum PON1 and LP-PLA₂ activity among groups were compared. Relationship between PON1, LP-PLA₂ activity and coronary lesions degree and plaque stability was analysed. **Results** The serum PON1 activity of coronary heart disease group was significantly lower than the control group($P < 0.05$). PON1 activity decreased with increasing coronary lesion count($P < 0.05$). The unstable plaque group was obviously lower than that of PON1 activity in the stable plaque group($P < 0.05$). LP-PLA₂ activity levels in the team significantly were higher than the control group($P < 0.05$). LP-PLA₂ activity increased with increasing coronary lesion count($P < 0.05$). LP-PLA₂ activity was positively correlated with total cholesterol and LDL levels. **Conclusion** Serum PON1 and LP-PLA₂ activity correlated with the incidence of coronary heart disease and coronary artery lesion count.

基金项目:上海申康市级医院适宜技术推广应用项目(SHDC12012210);上海市宝山区科技发展基金资助项目(12-E-63)

作者单位:201900 上海交通大学医学院附属第九人民医院心内科

通讯作者:张俊峰,主任医师,电子信箱:jfzhang_dr@163.com