

Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 和卵巢癌的关系

李杉, 尤琪, 武金玉, 李云秀, 袁海涛, 程丛丛

哈尔滨医科大学附属第一医院妇产科, 黑龙江 哈尔滨 150001

摘要: **目的** 探讨 Wnt 配体家族在鉴别诊断卵巢癌中的应用价值。**方法** 应用免疫组织化学 SP 法检测 58 例卵巢癌、32 例正常卵巢上皮组织的石蜡包埋组织中 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 蛋白的表达情况。**结果** 与正常卵巢组织相比, Wnt-1 和 Wnt-7a 蛋白在卵巢癌阳性中表达率较高, Wnt-5a 蛋白在卵巢癌中阳性表达率较低 (P 均 < 0.01)。卵巢癌组织中 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 的表达在不同年龄、有无淋巴结转移者中无统计学差异 ($P > 0.05$), Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 在不同病理类型患者中表达有统计学差异 ($P < 0.01$)。**结论** Wnt 配体家族的表达与卵巢癌有一定关系, 可用于卵巢癌的早期诊断。开发用于卵巢癌基于 Wnt 信号通路的靶向治疗药物将成为可能。

关键词: Wnt-1; Wnt-5a; Wnt-7a; 卵巢癌; 免疫组化

中图分类号: R 737.31 R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)02-0158-04

Relationship between Wnt-1, Wnt-5a, Wnt-7a and ovarian cancer

LI Shan, YOU Qi, WU Jin-yu, LI Yun-xiu, YUAN Hai-tao, CHENG Cong-cong

Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China

Corresponding author: YOU Qi, E-mail: vqvicky2001@sina.com

Abstract: Objective To study the application value of Wnt ligand family in differential diagnosis of ovarian cancer.

Methods Immunohistochemical SP method was used to detect the expressions of Wnt-1, Wnt-5a and Wnt-7a proteins in paraffin embedded tissues of 58 cases of ovarian cancer and 32 cases of normal ovarian epithelial tissues. **Results** Compared with normal ovarian tissues, the expressions of Wnt-1 and Wnt-7a proteins were significantly higher, and the expression of Wnt-5a protein was significantly lower in ovarian cancer tissues (all $P < 0.01$). The expressions of Wnt-1, Wnt-5a and Wnt-7a proteins in ovarian cancer tissues were not correlated with age and lymph node metastasis (all $P > 0.05$), but they were significantly correlated with pathological type (all $P < 0.01$). **Conclusions** The expression level of Wnt ligand family is related to ovarian cancer and can be used for early diagnosis of ovarian cancer. It will become possible to develop Wnt signaling pathway-based targeted therapy drugs for the treatment of ovarian cancer.

Key words: Wnt-1; Wnt-5a; Wnt-7a; Ovarian cancer; Immunohistochemistry

Fund program: Project Supported by Heilongjiang Post Doctoral Research Fund (LBH-Q15098)

上皮性卵巢癌是最常见的卵巢恶性肿瘤, 约占卵巢恶性肿瘤的 90%^[1]。自首次发现 Wnt-1 在小鼠乳腺中的致癌活性以来, 发现 Wnt 信号通路在癌症中具有复杂作用。Wnt 通路及其下游效应器调节各种过程对于癌症进展很重要, 包括肿瘤起始、肿瘤生长、细胞衰老、细胞死亡、分化和转移^[2]。本文分析 Wnt 配体家族与卵巢癌的关系及其对卵巢癌的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集哈尔滨医科大学附属第一医院 2016 年 9 月至 2018 年 4 月正常卵巢上皮组织 32 例,

年龄 31 ~ 75 (52.90 ± 10.27) 岁; 卵巢癌上皮组织 58 例, 年龄 40 ~ 80 (50.00 ± 8.32) 岁。癌组织学分型: 浆液性囊腺癌 22 例, 粘液性囊腺癌 18 例, 未分化癌 15 例, 不能分类 3 例。临床标本要求患者既往无卵巢肿瘤病史, 术前均未接受过放疗或其他特殊治疗, 并在取样本前充分告知患者用途, 并取得患者同意。

1.2 药物与试剂 博奥森 (Bioss) 公司 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 多克隆抗体 (工作浓度 1:500) 和免疫组化染色试剂盒均购自北京中杉金桥生物有限公司。

1.3 方法 免疫组化 SP 法: 标本经 4% 中性甲醛溶

液固定 24 h、石蜡包埋、连续 4 μm 切片。然后采用免疫组化(SP)进行染色,试验过程严格按试剂盒说明书进行,主要步骤为:经脱蜡、抗原的修复、血清封闭、加抗体,最后二氨基联苯胺(DAB)显色、苏木精复染、封片。免疫组化染色结果判定:光镜下观察细胞质出现淡黄色、棕黄色或褐色颗粒为有免疫反应,每张切片在阳性染色较高区选择 5 个高倍视野($\times 400$),连续计数至少 1 000 个细胞,计算阳性细胞的百分率,取平均值。阳性染色强度评分:(1)阳性细胞数占总细胞数 $< 5\%$ 评分为 0 分;(2)阳性细胞数占总细胞数 $\geq 5\%$ 且 $< 25\%$ 评分为 1 分;(3)阳性细胞数占总细胞数 $\geq 25\%$ 且 $< 50\%$ 评分为 2 分;(4)阳性细胞数占细胞总数 $\geq 50\%$ 且 $< 75\%$ 评分为 3 分;(5)阳性细胞数占总细胞数 $\geq 75\%$ 评分为 4 分。最后总分为阳性染色细胞数面积与染色强度乘积 ≥ 2 分作为阳性判断标准。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计处理,计数资料比较行 χ^2 检验,相关分析采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

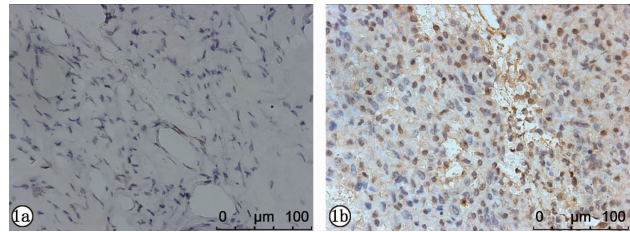
2 结果

2.1 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 蛋白在卵巢癌及正常卵巢细胞中阳性表达的比较 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 蛋白均在细胞质中表达。与正常卵巢组织比较,Wnt-1 和 Wnt-7a 蛋白在卵巢癌中阳性表达率较高,Wnt-5a 蛋白在卵巢癌中阳性表达率较低(P 均 < 0.01)。见表 1。Wnt-1、Wnt-5a 和 Wnt-7a 蛋白在卵巢癌及正常卵巢组织中的表达病理图见图 1、图 2、图 3。

2.2 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 蛋白的阳性表达率与卵巢癌病理特征相关因素分析 不同年龄、有无淋巴结转移患者卵巢癌组织中 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 蛋白阳性表达率无统计学差异(P 均 > 0.05),不同病理类型卵巢癌 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 蛋白阳性表达率有统计学差异(P 均 < 0.01)。见表 2。

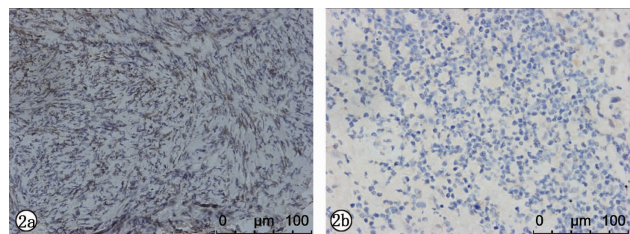
表 1 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 蛋白在卵巢癌及正常卵巢细胞中阳性表达率比较 例(%)

组别	例数	Wnt-1 阳性	Wnt-5a 阳性	Wnt-7a 阳性
正常卵巢组	32	12(37.50)	25(78.12)	10(31.25)
卵巢癌组	58	49(84.48)	20(34.48)	46(79.31)
χ^2 值		20.843	15.711	20.264
P 值		0.000	0.000	0.000



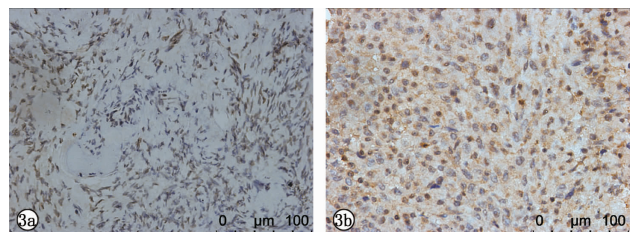
注:1a:正常卵巢细胞;1b:卵巢癌细胞。

图 1 Wnt-1 在正常卵巢细胞和卵巢癌细胞中的表达 (SP 染色, $\times 400$)



注:2a:正常卵巢细胞;2b:卵巢癌细胞。

图 2 Wnt-5a 在正常卵巢细胞和卵巢癌细胞中的表达 (SP 染色, $\times 400$)



注:3a:正常卵巢细胞;3b:卵巢癌细胞。

图 3 Wnt-7a 在正常卵巢细胞和卵巢癌细胞中的表达 (SP 染色, $\times 400$)

表 2 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 蛋白阳性表达率与卵巢癌病理特征的关系 例(%)

病理特征	例数	Wnt-1			Wnt-5a			Wnt-7a		
		阳性	χ^2 值	P 值	阳性	χ^2 值	P 值	阳性	χ^2 值	P 值
年龄										
< 50 岁	22	16(72.73)	0.037	0.084	4(18.18)	0.022	0.882	15(68.18)	0.296	0.587
≥ 50 岁	36	27(75.00)			6(16.67)			22(61.11)		
病理类型										
浆液性囊腺癌	22	20(90.91)	26.869	0.000	11(50.00)	10.589	0.005	14(63.64)	16.231	0.000
粘液性囊腺癌	18	12(66.67)			7(38.89)			10(55.56)		
未分化癌	15	1(6.67)			0			0		
不能分类	3	0			0			0		
淋巴结转移										
有	31	21(67.74)	0.047	0.829	3(9.68)	2.670	0.102	15(48.39)	0.758	0.348
无	27	19(70.37)			7(25.93)			10(37.04)		

3 讨论

卵巢恶性肿瘤发病机制复杂,且病因尚不明确^[3]。Wnt 信号通路是一组信号转导通路,在细胞命运规范、细胞增殖和细胞迁移中起重要作用^[4]。Wnt 是一类分泌型糖蛋白,作为细胞信号分子,参与细胞、发育过程和癌症等多种疾病^[5]。Wnt 及其下游效应物调节对癌症进展的各种重要过程。因此,抑制这一途径已成为癌症研究的一个新焦点,Wnt 通路也应该发展作为单一药物或合并其他靶向药物治疗卵巢癌的潜在靶点^[6]。

Wnt 信号通路主要包括 3 个分支:(1)经典 Wnt/ β -catenin 信号途径,该途径通过 β -连环素(β -catenin)的核异位,激活靶基因的转录活性。(2)平面细胞极性通路(planar cell polarity pathway),涉及 RhoA 和 Jun N 端激酶以及细胞骨架的重排。(3)Wnt/ Ca^{2+} 途径,由 Wnt-5a 和 Wnt-11 激活,增加细胞内 Ca^{2+} 含量,激活蛋白酶 C、磷脂酶 C 和转录因子活化 T 细胞的核因子(NF-AT)。Wnt/ Ca^{2+} 途径可以和典型的 Wnt/ β -catenin 信号途径相互作用。Wnt 蛋白可分为两类:Wnt-1 类和 Wnt-5a 类。Wnt-1 类蛋白有:Wnt-1、Wnt-3、Wnt-3a、Wnt-7a、Wnt-8a 和 Wnt-8b;Wnt-5a 类包括 Wnt-2、Wnt-4、Wnt-5a、Wnt-5b、Wnt-6、Wnt-7b 和 Wnt-11^[7]。Wnt-1 是 Wnt 经典信号通路中的主要成员之一,最初的 Wnt-1 是在小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)诱导的小鼠乳腺肿瘤染色体插入位点分析中分离出来的。在 Wnt 信号通路中:Wnt-1 蛋白信号进入胞内后,将信号传递给 Dsh(Dishevelled)蛋白,活化的 Dsh 抑制由轴蛋白(axial protein, Axin)、腺瘤性结肠息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)和丝氨酸/苏氨酸糖原合成酶 3 β (serin/threonine glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)组成的复合物的活性,使 β -catenin 不能被磷酸化。磷酸化的 β -catenin 才能被包浆内的蛋白酶体降解,由于非磷酸化的 β -catenin 不能被蛋白酶体所降解,从而导致 β -catenin 在包浆内积聚,并移向核内。当游离的 β -catenin 进入细胞核内,即可与转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子(T-cell factor/Lymphoid enhancer factor, TCF/LEF)结合,激活 TCF 转录酶,调节靶基因的表达,产生异常蛋白,使细胞发生癌变^[8]。

Wnt-5a 最早由 Thomas Jefferson 大学的 Clark 等发现,由 1 172 个腺嘌呤、884 个胞嘧啶、946 个鸟嘌呤、1 172 个胸腺嘧啶组成^[9],是高度进化的保守非经典 Wnt 配体,在胚胎形态发生过程中调节平面细胞极性、会聚延伸和上皮-间充质相互作用起着关键

作用^[10]。Wnt-5a 信号通路的异常激活或抑制是肿瘤发生的重要事件,同时发挥致癌和抑瘤作用^[11]。在某些类型的癌症,如血液系统恶性肿瘤和结直肠癌中,Wnt-5a 失活并发挥肿瘤抑制功能,而在其他癌症,如黑色素瘤和胃癌中,Wnt-5a 被过度表达并促进肿瘤进展^[12]。本研究中,观察到卵巢癌组织中 Wnt-5a 阳性表达率显著低于正常组织,提示 Wnt-5a 可能在卵巢癌中发挥肿瘤抑制功能,对于其在不同肿瘤中表现出相反的生物学功能,推测可能与激活的细胞表面受体不同有关。Wnt-5a 对卵巢癌细胞的存活、粘附和侵袭还有待进一步研究。

Wnt-7a(无翅型 MMTV 整合位点家族,成员 7a)是一种分泌型糖蛋白,通过控制细胞增殖和分化在肿瘤的发生和发展中起着至关重要的作用^[13]。Wnt-7a 基因位于人类染色体 3p25 19 上,Wnt-7a 蛋白质作为经典信号通路的配体,结合特定受体,卷曲,激活经典的 Wnt/ β -catenin 途径,诱导癌变或更多的恶性表现^[14-15]。在侵袭性或高水平浆液性卵巢癌细胞(SKOV3、IP1、KuraMoCo、OVCAR4 和 OVSAHO)中观察到丰富的 Wnt-7a (> 1 000 倍)。KuraMoCo1、OVCAR4 和 OVSAHO 细胞已通过基因组谱分析证实为高级别浆液性卵巢癌细胞系^[16]。SKOV3、IP1 细胞具有较高的侵袭性和转移性,因为这些细胞是从腹水中分离出来的^[17]。ES2、OVCAR3 和 OVCAR5 细胞具有与浆液性卵巢癌肿瘤部分相似的基因组谱。

本研究的重要结论是 Wnt-1、Wnt-5a、Wnt-7a 存在于卵巢癌标本中。也同样发现 Wnt-1、Wnt-7a 在卵巢癌细胞中激活 Wnt 信号通路,并与肿瘤细胞的生长有关,是抑制卵巢癌生长和扩散的新靶点。因此,Wnt 信号通路的异常激活促进了肿瘤的发生和发展^[18],更多的关键蛋白需要在 Wnt 通路中进行研究,并作为卵巢癌治疗的靶点,这将有助于开发更有效的治疗方案。许多药物是基于 Wnt 信号的异常而发展起来的。癌症治疗也抑制或杀死癌细胞,但不在癌干细胞中。所以需要合成新药,重点是杀死癌干细胞。将基于对 Wnt 信号通路的解除,开发对抗肿瘤干细胞的新药物^[19]。在不久的将来,卵巢癌患者 Wnt 信号通路靶向治疗将成为可能^[20]。

参考文献

- [1] Hou M, Cheng Z, Shen H, et al. High expression of CTHRC1 promotes EMT of epithelial ovarian cancer (EOC) and is associated with poor prognosis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34): 35813-35829.
- [2] Jannesari-Ladani F, Hossein G, Monhasery N, et al. Wnt5a influences viability, migration, adhesion, colony formation, E- and N-cadherin expression of human ovarian cancer cell line SKOV-3[J]. *Fo-*

- lia Biol(Praha), 2014, 60(2):57-67.
- [3] Akalay I, Tan TZ, Kumar P, et al. Targeting WNT1-inducible signaling pathway protein 2 alters human breast cancer cell susceptibility to specific lysis through regulation of KLF-4 and miR-7 expression [J]. *Oncogene*, 2015, 34(17):2261-2271.
- [4] Le PN, McDermott JD, Jimeno A. Targeting the Wnt pathway in human cancers; therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28 [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 146:1-11.
- [5] Bozorgmehr B, Adita J, Prachi Y, et al. Wnt gene cluster in ventral ectoderm patterning of *Drosophila* embryo [J]. *Indian J Genet*, 2015, 75(1):23-29.
- [6] Arend RC, Londoño-Joshi AI, Straughn JM Jr, et al. The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: a review [J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 131(3):772-779.
- [7] 张世蕪, 张旭. Wnt 信号通路在肿瘤调控方面的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(1):14-18.
- [8] Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(1):11-26.
- [9] 秦月明, 梁文红. Wnt 非经典通路中 Wnt5a 的研究现状 [J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(5):725-728.
- [10] Oishi I, Suzuki H, Onishi N, et al. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway [J]. *Genes Cells*, 2003, 8(7):645-654.
- [11] McDonald SL, Silver A. The opposing roles of Wnt-5a in cancer [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(2):209-214.
- [12] Bauer M, Bénard J, Gaasterland T, et al. WNT5A encodes two isoforms with distinct functions in cancers [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e80526.
- [13] Wang Y, Wei J, Zhang S, et al. Overexpression of Wnt7 α protein predicts poor survival in patients with colorectal carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(11):8781-8787.
- [14] Hayashi K, Burghardt RC, Bazer FW, et al. WNTs in the ovine uterus: potential regulation of periimplantation ovine conceptus development [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(7):3496-3506.
- [15] Yoshioka S, King ML, Ran S, et al. WNT7A regulates tumor growth and progression in ovarian cancer through the WNT/ β -catenin pathway [J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(3):469-482.
- [16] MacLean JA 2nd, King ML, Okuda H, et al. WNT7A regulation by miR-15b in ovarian cancer [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5):e0156109.
- [17] Domeke S, Sinha R, Levine DA, et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles [J]. *Nat Commun*, 2013, 4:2126.
- [18] Seagle BL, Dandapani M, Yeh JY, et al. Wnt signaling and survival of women with high-grade serous ovarian cancer: a brief report [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26(6):1078-1080.
- [19] Prakash R, Rajesh R. Regulation of non-canonical Wnt signaling pathway in stem cells development and carcinogenesis [J]. *Prakash and Rajesh, IJPSR*, 2015, 6(1):85-90.
- [20] Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(1):11-26.

收稿日期:2018-07-21 修回日期:2018-08-08 编辑:王宇

(上接第 157 页)

- [16] 张兴华, 张杰, 罗鹏程, 等. 钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II δ 通过 Wnt/ β -连环素通路调节前列腺癌细胞增殖和侵袭 [J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(4):1048-1051.
- [17] Nguyen CH, Brenner S, Huttary N, et al. 12S-HETE increases intracellular Ca^{2+} in lymph-endothelial cells disrupting their barrier function in vitro; stabilization by clinical drugs impairing calcium supply [J]. *Cancer Lett*, 2016, 380(1):174-183.
- [18] Yoshimura T, Hamada T, Hijioka H, et al. PCP4/PEP19 promotes migration, invasion and adhesion in human breast cancer MCF-7 and T47D cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31):49065-49074.
- [19] 冉江华, 郑克谱, 李望, 等. 钙调素依赖蛋白激酶家族 II 表达调控对大鼠肝细胞 BRL-3A 凋亡的影响 [J]. *中华器官移植杂志*, 2017, 38(4):239-243.
- [20] Amith SR, Wilkinson JM, Fliegel L. Na^+/H^+ exchanger NHE1 regulation modulates metastatic potential and epithelial-mesenchymal transition of triple-negative breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16):21091-21113.
- [21] 王媛媛, 张玉超, 陈吉翠, 等. 利拉鲁肽通过激活 CAMKK2/AMPK 通路促进骨骼肌 FNDC5 的表达 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(3):475-480.
- [22] Marcelo KL, Ribar T, Means CR, et al. Research rResource: roles for calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) in systems metabolism [J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 30(5):557-572.

收稿日期:2018-07-25 修回日期:2018-08-25 编辑:王国品