

Wnt2 在不同肿瘤患者血清中水平的探讨^{*}

郭变琴, 陆芸瑶, 黄学梅[△] (重庆市肿瘤研究所检验科 400032)

【摘要】 目的 检测多种肿瘤患者(乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、肝癌)血清中 Wnt2 水平, 评价 Wnt2 在肿瘤中的临床应用价值。**方法** 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测多种肿瘤患者血清中 Wnt2 水平。**结果** 与健康者比较, 乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌患者血清中 Wnt2 水平均明显升高(均 $P < 0.05$), 肝癌患者血清中 Wnt2 水平明显降低($P < 0.05$), 肺癌患者血清中 Wnt2 水平无明显变化($P > 0.05$)。**结论** Wnt2 在不同类别的肿瘤中水平不一致, 可能在不同类别的肿瘤中起不同的作用。

【关键词】 Wnt2; 肿瘤; 酶联免疫吸附试验

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 22. 006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)22-3103-02

A preliminary study of serum Wnt2 level in patients with various tumors^{*} GUO Bian-qin, LU Yun-yao, HUANG Xue-mei[△] (Department of Clinical Laboratory, Chongqing Municipal Tumor Institute, Chongqing 400032, China)

【Abstract】 Objective To study the serum Wnt2 level in the patients with various tumors(breast cancer, ovarian cancer, cervical cancer, lung cancer, liver cancer)for evaluating its clinical application value in tumor. **Methods** The serum Wnt2 level in the patients with various tumors was detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** Compared with the healthy group, the serum Wnt2 level in breast cancer, ovarian cancer and cervical cancer was significantly increased($P < 0.05$), the serum Wnt2 level in the patients with hepatocellular carcinoma was significantly decreased, while which in the patients with lung cancer had no significant change. **Conclusion** The serum Wnt2 level is not consistent and may play different role in different types of tumor.

【Key words】 Wnt2; tumor; enzyme linked immunosorbent assay

Wnt 信号通路不仅在胚胎发育调控中起重要作用, 而且它与人类肿瘤的发生和发展也息息相关, 并在多种肿瘤中得到证实, 是现今肿瘤研究的热点。目前已发现, 人类 Wnt 基因家族共有 19 个成员, 它们编码的产物均为分泌型糖蛋白, 含一段信号肽及 23 或 24 个位置保守的半胱氨酸残基^[1]。Wnt2 是经典 Wnt 信号通路的成员之一, 目前被广泛认为是一种癌基因, 该基因定位于染色体 7q31.3 上。近年相继发现, Wnt2 在某些肿瘤中表达上调, 如结肠癌、胃癌、食管腺癌等^[2-4]。本课题前期研究表明 Wnt2 在乳腺癌组织中高表达, 又基于 Wnt2 是一种分泌型糖蛋白, 作者进一步探讨 Wnt2 在乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、肝癌患者血清中的水平, 为深入研究 Wnt2 在肿瘤中的作用奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择重庆市肿瘤医院住院的肿瘤患者 77 例作为研究对象, 其中乳腺癌 38 例、卵巢癌 10 例、宫颈癌 8 例、肺癌 13 例、肝癌 8 例。所有患者均为女性且均经病理确诊, 所有标本除乳腺癌有 2 例为术后正接受化疗外, 其余病例均为术后复发就诊患者。选择同期在重庆市肿瘤医院健康体检的 30 例健康成年女性作对照, 排除乳腺增生。所有研究对象均征得本人知情同意。

1.2 仪器与试剂 人无齿型 MMTV 整合位点成员酶联免疫分析试剂盒购于武汉华联科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 研究对象均于清晨空腹采集肘静脉血, 2 h 内分离血清, 分装后于一 80 ℃ 低温冰箱保存待检; 检测前融解, 并进一步离心, 待检。

1.3.2 检测方法 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测可溶性 Wnt2 在血清中的水平。(1)96 孔酶标反应板中, 设标准品 10 孔(稀释后各孔加样量都为 50 μL, 浓度分别为 6、4、2、1、0.5 ng/mL)、空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)、待测样品孔;(2)在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL, 然后再加待测样品 10 μL(样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样品加于酶标板孔底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀, 37 ℃ 温育 30 min, 洗板 5 次, 每次均拍干;(3)每孔加入酶标试剂 50 μL, 空白孔除外, 37 ℃ 温育 30 min, 洗板 5 次, 每次均拍干。每孔先加入显色剂 A 50 μL, 再加入显色剂 B 50 μL, 轻轻震荡混匀, 37 ℃ 避光显色 15 min;(4)每孔加终止液 50 μL, 终止反应(此时蓝色立转黄色)。以空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔吸光度(A 值);(5)以血清 Wnt2 标准品的 A 值为纵坐标(取双复孔浓度的平均值), 标准品稀释浓度为横坐标, 绘制标准品曲线, 根据标准品曲线计算出待测血清 Wnt2 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$

^{*} 基金项目: 重庆市第八批科技计划项目(cstc2014jcyjA10106)。

作者简介: 郭变琴, 女, 博士, 主管技师, 主要从事临床检验工作。 [△] 通讯作者, E-mail: exuw_1213@sina.com。

为差异有统计学意义。

2 结 果

健康者血清中 Wnt2 水平为 $(1.23 \pm 0.69) \text{ ng/mL}$, 乳腺癌患者为 $(7.22 \pm 3.26) \text{ ng/mL}$, 卵巢癌患者为 $(5.55 \pm 3.89) \text{ ng/mL}$, 宫颈癌患者 $(8.89 \pm 3.68) \text{ ng/mL}$, 肝癌组患者 $(0.02 \pm 0.02) \text{ ng/mL}$, 肺癌患者为 $(0.88 \pm 0.35) \text{ ng/mL}$; 与健康者比较, 乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌患者血清中 Wnt2 水平均明显升高 (均 $P < 0.05$), 肝癌患者血清中 Wnt2 水平明显降低 ($P < 0.05$), 肺癌患者血清中 Wnt2 水平无明显变化 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

Wnts 是一类广泛存在的分泌型糖蛋白, 相对分子质量约 40×10^3 , 通过与细胞表面、细胞外基质的联系而体现信使的作用, 再通过复杂的信号传递通路控制胚胎早期发育, 决定细胞分化、细胞增殖及生长调节, 而当其影响因素发生变化使其活化过度或失调时, 便会导致机体发育异常或形成肿瘤^[5]。目前, Wnt2 被广泛认为是一种致癌基因, 然而, 其在肿瘤中的作用报道不多。有研究证实, 食管细胞癌中, 肿瘤纤维母细胞分泌的 Wnt2 通过激活 Wnt2- β 连环蛋白信号通路, 促进食管癌细胞的生长^[6]; 此外, Wnt2 能通过自分泌或旁分泌实途径诱导乳腺上皮细胞形态发生改变^[7]; 尤其是新近对 Wnt2 的报道引起了作者极大的兴趣, 麻省总医院癌症中心的研究人员通过芯片设备成功捕获了人胰腺癌小鼠模型血液中的循环肿瘤细胞, 并分别对胰腺循环肿瘤细胞、原发肿瘤细胞和正常胰腺组织进行了 RNA 表达水平分析, 结果发现 Wnt2 基因在胰腺癌中的表达量高于正常组织, 尤其在循环肿瘤细胞和转移性细胞中表达量特别高^[8]。又鉴于 Wnt 基因编码的产物为分泌型糖蛋白, 并含有一段信号肽, 因此作者推测 Wnt2 可分泌至肿瘤患者血清中。

以往研究者对 Wnt2 的研究主要聚焦在肿瘤组织或细胞株中, 对于肿瘤患者血清中 Wnt2 的表达水平, 尚未见研究报道。本课题组在前期对乳腺癌的研究中发现, Wnt2 高表达在乳腺癌组织上皮及间质细胞中。在本研究中, 作者进一步收集了乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、肝癌的患者血清, 并通过 ELISA 技术检测 Wnt2 在血清中的水平, 与健康者比较, 乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌患者血清中 Wnt2 水平均明显升高 (均 $P < 0.05$), 肝癌患者血清中 Wnt2 水平明显降低 ($P < 0.05$), 肺癌患者血清中 Wnt2 水平无明显变化 ($P > 0.05$)。由此可见, Wnt2 在妇科肿瘤患者血清中的水平明显增加。有研究也表明, BRCA1 及 BRCA2 基因是卵巢癌的高危遗传基因。Jazaeri^[9] 采用 cDNA 基因芯片的方法发现携带 BRCA2 基因的卵巢癌与 Wnt2 和 SFRP4 密切相关, 该结果也间接提示了 Wnt2 与卵巢癌的相关性。结合本课题的实验结果, 作者推测 Wnt2 在妇科肿瘤的发生中可能起着重要作用, 然而其在妇科肿瘤中的作用机理尚需进一步验证。本研究中作者也发现, 与健康人群比较, 肝癌患者血清中 Wnt2 水平明显降低。而最近文献^[10]报道, 通过对一个 70% 肝切除的肝脏再生小鼠模型研究发现, Wnt2 在触发肝细胞的再生中起一定作用。但本研究所

选肝癌病例为术后复发就诊患者, 因而肝脏的再生能力较健康人降低, 这可能是肝癌患者血清中 Wnt2 水平较健康人低的原因。

此外, 本课题中宫颈癌、卵巢癌、肺癌及肝癌所收集的样本量偏小, 因此本课题所得出的结果仅仅是初步的, 后续尚需大样本进一步验证。在下一步的试验中, 作者将通过组织芯片技术, 来检测处于不同临床分期的妇科肿瘤中 Wnt2 的表达情况, 进一步探讨 Wnt2 在妇科肿瘤中的作用机理, 若试验结果证实 Wnt2 在妇科肿瘤中的表达量与恶性程度相关, 作者将在后续试验中进一步收集不同恶性程度的妇科肿瘤患者血清, 来证实 Wnt2 在妇科肿瘤患者血清中的表达与妇科肿瘤恶性程度是否相关, 是否能作为妇科肿瘤的筛查、预后评估、预后监测的指标而应用于临床。

参考文献

- [1] Miller JR. The Wnts[J]. *Genome Biol*, 2001, 3(1): 1-15.
- [2] Park JK, Song JH, He TC, et al. Overexpression of Wnt-2 in colorectal cancers [J]. *Neoplasma*, 2009, 56 (2): 119-123.
- [3] Cheng XX, Wang ZC, Chen XY, et al. Frequent loss of membranous E-cadherin in gastric cancers; A cross-talk with Wnt in determining the fate of beta-catenin[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22(1): 85-93.
- [4] Clément G, Braunschweig R, Pasquier N, et al. Alterations of the Wnt signaling pathway during the neoplastic progression of Barrett's esophagus [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (21): 3084-3092.
- [5] Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways; recent progress [J]. *Growth Factors*, 2005, 23(2): 111-116.
- [6] 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.
- [7] Brown AM. Wnt signaling in breast cancer; have we come full circle[J]. *Breast Cancer Res*, 2001, 3(6): 351-355.
- [8] Yu M, Ting DT, Stott SL, et al. RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis[J]. *Nature*, 2012, 487(748): 510-513.
- [9] Jazaeri AA. Molecular profiles of hereditary epithelial ovarian cancers and their implications for the biology of this disease[J]. *Mol Oncol*, 2009, 3(2): 151-156.
- [10] Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration[J]. *Nature*, 2010, 468(7321): 310-315.