

β-catenin、Wnt3a 和 Lgr5 在不同宫颈病变组织中的表达及其意义

丁 锦 ,詹乔乔 ,何莲芝 ,倪观太

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 妇产科 ,安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 检测 β-catenin、Wnt3a 和 Lgr5 在正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变(包括 CIN I、CIN II ~ III)、宫颈癌(CC) 中的表达情况, 研究其在宫颈病变发生发展中的意义及可能机制。方法: 采用免疫组织化学法(SP) 检测正常宫颈、CIN 及 CC 标本中 β-catenin、Wnt3a 和 Lgr5 的表达, 并行相关性分析。结果: β-catenin、Wnt3a、Lgr5 的阳性表达在正常宫颈组织组、CIN I 组、CIN II ~ III 组、CC 组 4 组中比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。宫颈癌中 β-catenin 和 Wnt3a 的表达呈正相关($P < 0.05$) ; β-catenin 和 Lgr5 的表达也呈正相关($P < 0.05$) ; 而宫颈癌中 Lgr5 和 Wnt3a 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: β-catenin、Wnt3a 和 Lgr5 的异常表达可能影响宫颈癌的发生发展。

【关键词】宫颈癌; Wnt 信号通路; β-catenin; Wnt3a; Lgr5

【中图分类号】R 737.33 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2017.05.008

Expression of β-catenin , Wnt3a and Lgr5 and their significance in different cervical lesions

DING Jin ZHAN Qiaoqiao HE Lianzhi NI Guantai

Department of Obstetrics and Gynecology , The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College , Wuhu 241001 , China

【Abstract】Objective: To determine the expression of β-catenin , Wnt3a and Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5(Lgr5) in normal cervical tissues , cervical intraepithelial neoplasia (including CIN I , CIN II - III) and cervical cancer (CC) , and to investigate the significance of those proteins in the cervical lesions and potential mechanisms. **Methods:** Immunohistochemical method (SP method) was used to detect the expression of β-catenin , Wnt3a and Lgr5 in normal cervical tissues , CIN and CC specimens , and the correlation was analyzed among the proteins. **Results:** The positive expression of β-catenin , Wnt3a and Lgr5 was significantly different in the specimens from normal cervix , CIN I , CIN II - III and CC group , with significant difference($P < 0.05$) . β-catenin and Wnt3a as well as β-catenin and Lgr5 were positively correlated in cervical cancer ($P < 0.05$) , yet there was no significant difference in the expression of Lgr5 and Wnt3a($P > 0.05$) . **Conclusion:** Abnormal expression of β-catenin , Wnt3a and Lgr5 may affect the occurrence and development of cervical cancer.

【Key words】 cervical cancer; Wnt signal pathway; β-catenin; Wnt3a; Lgr5

子宫颈癌(cervical cancer ,CC) 是女性常见的恶性肿瘤, 其发生机制极其复杂, 为得到更好的早期干预及诊治策略, 研究其发生发展的分子机制十分必要。研究表明^[1], Wnt/β-catenin 信号通路在多种恶性肿瘤中处于激活状态, β-链蛋白(β-catenin) 是经典 Wnt 信号通路的关键信号分子, 在通路中处于中心地位, 它的激活或降解会导致 Wnt 信号通路的变化, Wnt3a 是经典 Wnt 通路中的上游介质^[2], Lgr5 参与 Wnt 通路在干细胞的调节已有文献报道^[3]。本文通过检测正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变、宫颈癌中 β-catenin、Wnt3a、Lgr5 的表达, 以探讨其异常表达与宫颈癌发生发展之间的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取我院病理科 2015 年 3 月 ~ 2016 年 9 月送检的不同宫颈组织标本(均为未接受过药物或物理治疗的手术标本), 包括宫颈癌组织(均为宫颈癌根治术手术标本) 61 例, 平均年龄(49.38±8.12) 岁, 其中鳞癌 49 例, 腺癌 12 例; 宫颈上皮内瘤变组织 30 例, 平均年龄(46.13±6.48) 岁, 其中 CIN I 12 例, CIN II ~ III 18 例; 正常宫颈组织(均为良性、非宫颈疾病的全子宫切除术标本) 19 例, 平均年龄(43.82±7.58) 岁。

1.2 试剂与方法

1.2.1 主要试剂与仪器 DAB 增强显影试剂盒、小

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金项目(WK2015F14)

收稿日期: 2017-03-25

作者简介: 丁 锦(1987-), 男, 住院医师, (电话) 15955305200 (电子信箱) 414019449@qq.com;

倪观太, 男, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, (电子信箱) 534498173@qq.com, 通信作者。

鼠抗 β -catenin 单克隆抗体(I 抗)、PV-6000(II 抗)、兔抗 Wnt3a 多克隆抗体(I 抗)、兔抗 Lgr5 多克隆抗体(I 抗)、PBS(0.01 mol/L ,pH7.4~7.6 粉剂)。切片机(RM-2235)、脱水机(LEICA ASP200S 型)、石蜡包埋机(Histocore Arcadia-C)、干燥箱(恒温 202W6S)、显微镜(DM2000) 等。

1.2.2 方法 所有标本 10% 福尔马林固定,脱水,石蜡包埋,切片(取宫颈组织 $<2\text{ cm}\times 1.5\text{ cm}$,厚度 $<3\text{ mm}$),HE 染色,SP 免疫组化染色,PBS 冲洗,显微镜下观察。

1.3 阳性判定 根据徐良中^[4]在文献中的阐述,阳性结果的判定需根据阳性细胞数量的多少及其染色强度共同来判定: 其中阳性细胞数量可分为无阳性细胞、阳性细胞 $\leq 25\%$ 、 $26\% \sim 50\%$ 、 $51\% \sim 75\%$ 、 $> 75\%$, 分别评 0 分、1 分、2 分、3 分及 4 分; 染色强度可分为棕褐色、棕黄色、淡黄色、无色, 分别评 3 分、2 分、1 分、0 分; 两者评分相加, ≥ 4 分为阳性。Wnt3a 阳性染色位于胞质, Lgr5 阳性染色则在胞质及胞膜。正常情况下, β -catenin 为连续的包膜表达, 病理状态下, 其可表达于胞质/核内, 胞膜 $<70\%$ 阳性或者胞质/核 $>10\%$ 阳性均为异常阳性表达。

1.4 统计学方法 各指标采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法; 相关分析采用 Pearson 等级相关。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 β -catenin 在不同宫颈组织中的表达 如表 1 所示, β -catenin 在本研究 110 例不同宫颈组织中, 异常表达标本共 58 例, 阳性率 52.73%。4 组阳性表达率比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 32.958, P < 0.05$)。组内每两组比较后发现, CIN II ~ III 组与 CIN I 组差异无统计学意义($\chi^2 = 0.096, P > 0.05$)。其余各组内比较, P 均 <0.05 , 差异均有统计学意义。

2.2 Wnt3a 在不同宫颈组织中的表达 如表 1 所示, Wnt3a 在本研究 110 例不同宫颈组织中, 异常表达标本共 42 例, 阳性率 38.18%。4 组阳性表达率比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 8.723, P < 0.05$)。组内每两组比较后发现, 相对于正常组, 其余 3 组中 Wnt3a 阳性率均较其高, P 均 <0.05 , 差异有统计学意义。而 CIN I 组与 CIN II ~ III 组($\chi^2 = 0.556$)、CIN I 组与 CC 组($\chi^2 = 0.002$)、CC 组与 CIN II ~ III 组($\chi^2 = 1.196$) 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 β -catenin、Wnt3a 和 Lgr5 在不同宫颈组织的表达

指标	组别				χ^2	P
	正常 宫颈组织	CIN I	CIN II ~ III	CC		
β -catenin						
+	1	4	7	46	32.958	<0.05
-	18	8	11	15		
Wnt3a						
+	2	5	10	25	8.723	<0.05
-	17	7	8	36		
Lgr5						
+	0	3	7	40	28.130	<0.05
-	19	9	11	21		

2.3 Lgr5 在不同宫颈组织中的表达 如表 1 所示, Lgr5 在本研究 110 例不同宫颈组织中, 异常表达标本共 50 例, 阳性率 45.45%。异常阳性比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 28.130, P < 0.05$)。组内每两组比较后, 正常组与其余 3 组均有统计学意义($P < 0.05$)。且 Lgr5 在 CC 组中的阳性表达与 CIN I 组($\chi^2 = 6.819, P < 0.05$)、CIN II ~ III 组($\chi^2 = 4.107, P < 0.05$) 比较, 差异均有统计学意义。CIN I 组阳性 Lgr5 表达与 CIN II ~ III 组($\chi^2 = 0.625, P > 0.05$) 无统计学意义。

2.4 宫颈癌组织中 β -catenin、Wnt3a 和 Lgr5 表达相关性分析 在 61 例宫颈癌组织中, β -catenin 阳性表达 46 例, Wnt3a 阳性表达 25 例, Lgr5 阳性表达 40 例; β -catenin 与 Wnt3a 共阳性表达 23 例, 共阴性表达 13 例($r_s = 0.321, \chi^2 = 6.288, P < 0.05$) , 两者表达正相关, 有统计学意义(见表 2)。 β -catenin 与 Lgr5 共阳性表达 35 例, 共阴性表达 10 例($r_s = 0.387, \chi^2 = 9.159, P < 0.05$) , 两者表达同样呈正相关, 有统计学意义(见表 3) 。Wnt3a 与 Lgr5 共阳性表达 13 例, 共阴性表达 9 例($r_s = -0.238, \chi^2 = 3.457, P > 0.05$) , 无统计学意义(见表 4)。

表 2 β -catenin 和 Wnt3a 在宫颈癌组织中的表达相关性

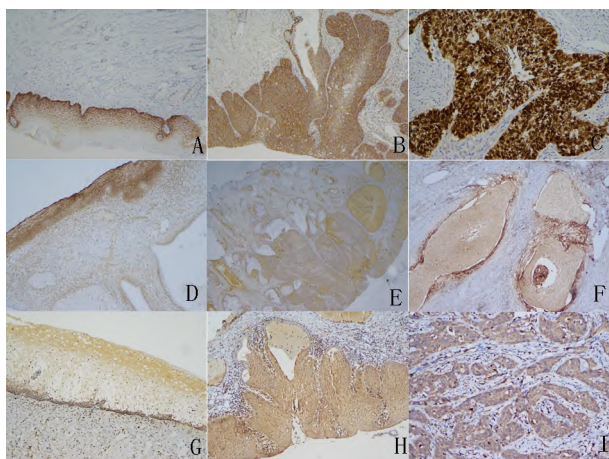
β -catenin	Wnt3a	
	阴性	阳性
阴性	13	2
阳性	23	23

表 3 β -catenin 和 Lgr5 在宫颈癌组织中的表达相关性

β -catenin	Lgr5	
	阴性	阳性
阴性	10	5
阳性	11	35

表 4 Wnt3a 和 Lgr5 在宫颈癌组织中的表达相关性

Lgr5	Wnt3a	
	阴性	阳性
阴性	9	12
阳性	27	13



A.β-catenin 在正常宫颈组织中的表达 ×100; B.β-catenin 在 CIN III 中的表达 ×40; C.β-catenin 在 CC 中的表达 ×40; D.Wnt3a 在正常宫颈组织中的表达 ×100; E.Wnt3a 在 CIN III 中的表达 ×100; F.Wnt3a 在 CC 中的表达 ×100; G.Lgr5 在正常宫颈组织中的表达 ×100; H.Lgr5 在 CIN III 中的表达 ×100; I.Lgr5 在 CC 中的表达 ×200。

图 1 β-catenin、Wnt3a 和 Lgr5 在不同宫颈组织中的免疫组化图

3 讨论

3.1 β-catenin 在不同宫颈组织中的表达及意义

Wnt/β-catenin 途径是一组保守的信号级联。β-catenin 是该通路的中心,已有研究发现 Wnt/β-catenin 信号通路的异常激活参与多种癌症的发生。崔楠^[5]在 Slug 修饰的宫颈癌细胞中检测到 GSK3β、β-catenin、细胞周期蛋白 D1 和 c-myc 的表达。本研究中 相较于正常组织,β-catenin 异常表达率在 CIN I、CIN II~III 及 CC 组升高,并随着宫颈病变程度稳定上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 CIN II~III 组内其异常表达率虽稍高于 CIN I,但无统计学意义($P > 0.05$)。提示 β-catenin 可能触发宫颈的病变,并影响宫颈从癌前病变到癌的过程。Shinohara^[6]提出子宫颈的恶性表型与 β-catenin 的质/核表达相关,且有 20% 的病例存在突变,该突变主要位于 CTNNB1(β-catenin 的编码基因)的外显子 3 因此 CC 的发生发展是复杂的,探究其发生机理还需更多的实验。

3.2 Wnt3a 在不同宫颈组织中的表达及意义

Wnt3a 是经典 Wnt 通路中的上游介质,在炎症中已被证实是一种调节剂^[2]。研究发现,通过激活经典

Wnt 通路,Wnt3a 可促进上皮间质转化和增强癌干细胞^[7]。Denysenko^[8]在星形胶质瘤的研究中发现,Wnt3a 及经典 Wnt/β-catenin 信号通路有助于恶性星形胶质细胞瘤的肿瘤发生和进展,是神经胶质瘤中细胞增殖的干性调节剂和增强子,与恶性肿瘤的级别强烈相关。本研究中,Wnt3a 在 4 组中的表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。与正常组比较,其余 3 组中 Wnt3a 阳性表达差异均有统计学意义。而 CIN I、CIN II~III 组、CC 组每两组比较, P 均 > 0.05 ,CIN I 组与 CIN II~III 组、CIN I 组与 CC 组、CC 组与 CIN II~III 组无统计学意义。提示 Wnt3a 可能主要作用于宫颈的早期病变,而在后期的发生发展中作用不大。

3.3 Lgr5 在不同宫颈组织中的表达及意义

Lgr5 是一种 G 蛋白偶联受体,属于肿瘤干细胞标志物,富含亮氨酸重复序列。近来,Lgr5 在小肠、结肠和毛囊的干细胞中阳性表达的报道^[9],表明了其在干细胞生物学中的潜在意义。Lgr5 的上调已经在许多人类肿瘤例如肝细胞癌^[10]、胃癌^[11]等恶性肿瘤中被报道。在这些癌症中,高 Lgr5 表达与肿瘤的发生、侵袭和肿瘤转移有关,表明 Lgr5 在肿瘤的发生中的潜在作用^[12]。本研究中,Lgr5 在正常宫颈组织无表达,而其阳性率在 CIN I 组、CIN II~III 组、CC 组中分别为 25%、38.89%、65.57%,CC 组更频繁地发现 Lgr5 的高表达 A 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组比较后发现,仅 CIN I 组中阳性 Lgr5 表达与 CIN II~III 组差异无统计学意义($P > 0.05$),正常组与 CIN I 组、正常组与 CIN II~III 组、正常组与 CC 组、CC 组与 CIN I 组、CC 组与 CIN II~III 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。提示 Lgr5 的高表达与 CC 的肿瘤进展相关,并可能参与癌细胞的增殖与侵袭。然而,Lgr5 在宫颈癌发展中的确切机制仍然未知,宫颈癌细胞中的 Lgr5 上调是否通过维持宫颈癌干细胞促成肿瘤发生,或仅仅是激活 Wnt 信号的反应,而没有直接的功能作用,这仍是我们不清楚的,需要进一步的研究来探究其基本分子机制。

3.4 β-catenin、Wnt3a 和 Lgr5 在宫颈癌中的相关性分析

对本研究中 β-catenin、Wnt3a 和 Lgr5 进行两两相关性分析后发现,宫颈癌中 β-catenin 和 Wnt3a 的表达呈正相关($P < 0.05$);β-catenin 和 Lgr5 的表达也呈正相关($P < 0.05$);Lgr5 是一个 Wnt 目标基因,并且 Wnt 通路在大多数结直肠癌的进展早期通过下调 APC 和较少的 β-catenin 突变被激活^[13]。而宫颈癌中 Lgr5 和 Wnt3a 的表达无统计学意义($P > 0.05$),说明 Lgr5 与 Wnt3a 的表达影响 Wnt 信号通

路的活性,引发宫颈癌细胞的异常增殖,进而导致癌症的发生。而 Lgr5 与 Wnt3a 之间的关系则需进一步的实验进行论证。

综上所述,检测宫颈组织的 β -catenin、Wnt3a 和 Lgr5 有助于给我们提供宫颈癌早期诊断及治疗的思路,宫颈癌的 Wnt 信号通路研究仍处于早期阶段,本研究的数据仅表明了 β -catenin、Wnt3a 和 Lgr5 可能促进宫颈癌的发生发展,而对于这 3 个指标如何相互促进肿瘤发生发展的确切机制及分子基础尚未完全了解。因此,需要进一步的实验来探索 Wnt 信号通路中各介质与宫颈癌的关系。

【参考文献】

[1] JAZI MS, NAJAFI SM. Beta-catenin Forms Protein Aggregation at High Concentrations in HEK293T Cells [J]. Iran J Med Sci, 2017, 42(1) : 66-72.
 [2] 潘刘翊,姚敏,顾娟娟,等. Wnt 通路关键信号分子 Wnt3a 在肝细胞性肝癌组织中的表达及临床病理学特征 [J]. 南通大学学报(医学版), 2016, 36(4) : 249-252.
 [3] CARMOM KS, LIN Q, GONG X, et al. LGR5 Interacts and Coincernalizes with Wnt Receptors To Modulate Wnt/ β -catenin Signaling [J]. Molecular & Cellular Biology, 2012, 32(11) : 2054-2064.
 [4] 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4) : 229-231.
 [5] CUI N, YANG WT, ZHENG PS. Slug inhibits the proliferation and tumor formation of human cervical cancer cells by up-regulating the p21/p27 proteins and down-regulating the activity of the Wnt/ β -

catenin signaling pathway via the trans-suppression Akt1/p-Akt1 expression [J]. Oncotarget, 2016, 7(18) : 26152-26167.
 [6] SHIOHARA A, YOKOYAMA Y, WAN X, et al. Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the beta-catenin gene is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix [J]. Gynecologic Oncology, 2001, 82(3) : 450.
 [7] QI L, SUN B, LIU Z, et al. Wnt3a expression is associated with epithelial-mesenchymal transition and promotes colon cancer progression [J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2014, 33(1) : 107.
 [8] DENYSENKO T, ANNOVAZZI L, CASSONI P, et al. WNT/ β -catenin Signaling Pathway and Downstream Modulators in Low- and High-grade Glioma [J]. Cancer Genomics & Proteomics, 2016, 13(1) : 31.
 [9] BARKER N, VAN ES JH, JAKS V, et al. Very long-term self-renewal of small intestine, colon, and hair follicles from cycling Lgr5+ve stem cells [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008, (73) : 351-356.
 [10] FUKUMA, MARIKO, EFFENDI, et al. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells [J]. Experimental Cell Research, 2013, 319(3) : 113-121.
 [11] WANG Z. Lgr5-Positive Cells are Cancer-Stem-Cell-Like Cells in Gastric Cancer [J]. Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology, 2014, 36(6) : 2447-2455.
 [12] MICHELOTTI G, JIANG X, SOSA JA, et al. LGR5 is associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6(33) : 34549-34560.
 [13] SCHNEIKERT J, BEHRENS J. The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development [J]. Gut, 2007, 56(3) : 417-425.

(上接第 435 页)

【参考文献】

[1] ROJAS V, HIRSHFIELD KM, GANESAN S, et al. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(12) : 2113.
 [2] BAX HJ, JOSEPHS DH, PELLIZZARI G, et al. Therapeutic targets and new directions for antibodies developed for ovarian cancer [C]//mAbs. Taylor & Francis, 2016, 8(8) : 1437-1455.
 [3] 刘云,杜成,刘文超. 卵巢癌治疗新进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(4) : 553-556.
 [4] BAUDITZ J. Effective treatment of gastrointestinal bleeding with thalidomide-Chances and limitations [J]. World journal of gastroenterology, 2016, 22(11) : 3158.
 [5] MELLIN GW, KATZENSTEIN M. The saga of thalidomide. Neuropathy to embryopathy, with case reports of congenital anomalies [J]. N Engl J Med, 1962, 267: 123.
 [6] ARAIH, FURUSUA, NISHINOT, et al. Thalidomide prevents the progression of peritoneal fibrosis in mice [J]. Acta Histochem Cytochem, 2011, 44(2) : 51-60.
 [7] RUAN J, MARTIN P, COLEMAN M, et al. Durable Responses with the Metronomic Regimen RT-PEPC in Elderly Patients with Recurrent Mantle Cell Lymphoma Cancer [J]. Cancer, 2010, 116

(11) : 2655-2664.
 [8] LI TH, HUANG CC, YANG YY, et al. Thalidomide Improves the Intestinal Mucosal Injury and Suppresses Mesenteric Angiogenesis and Vasodilatation by Down-Regulating Inflammation-Related Cascades in Cirrhotic Rats [J]. PloS one, 2016, 11(1) : e0147212.
 [9] HENNESSY BT, COLEMAN RL, MARKMAN M. Ovarian cancer [J]. The Lancet, 2009, 374(9698) : 1371-1382.
 [10] COPUR M S, GAUCHAN D, RAMAEKERS R, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary debulking surgery for stage IIIC ovarian cancer [J]. Journal of Clinical Oncology, 2016, 35(7) : 802-803.
 [11] QUACH H, RITCHIE D, STEWART AK, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma [J]. Leukemia, 2010, 24(1) : 22.
 [12] XU Y, SUN J, SHEARD MA, et al. Lenalidomide overcomes suppression of human natural killer cell anti-tumor functions by neuroblastoma microenvironment-associated IL-6 and TGF β 1 [J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2013, 62(10) : 1637-1648.
 [13] SIM GC, WU S, JIN L, et al. Defective STAT1 activation associated with impaired IFN- γ production in NK and T lymphocytes from metastatic melanoma patients treated with IL-2 [J]. Oncotarget, 2016, 7(24) : 36074.