

• 论著 •

Wnt-5a 基因在神经母细胞瘤中的表达及意义

刘 涛¹ 韩 英¹ 祝秀丹² 王焕民² 秦 红² 邹 焱¹

【摘要】 目的 本研究旨在研究神经母细胞瘤 Wnt-5a 基因的表达,并探讨其与肿瘤的临床分期、病理分型及对化疗的反应等的关系。**方法** 选择 2003 年至 2008 年住院治疗的 77 例神经母细胞瘤病例进行研究,其中恶性神经母细胞瘤病例(43 例)和节细胞性神经母细胞瘤病例(19 例)为实验组,良性神经节细胞瘤病例(15 例)为对照组。采用蛋白质免疫印迹杂交(Western blotting)方法检测肿瘤组织中 Wnt-5a 基因的表达。**结果** 与对照组[光密度值 $(4.79 \pm 0.75) \times 10^5$]相比,Wnt-5a 基因在实验组中的表达[1、2、3、4 和 4 s 期的光密度值分别为 $(2.87 \pm 0.43) \times 10^5$ 、 $(2.13 \pm 0.35) \times 10^5$ 、 $(2.07 \pm 0.44) \times 10^5$ 、 $(1.73 \pm 0.11) \times 10^5$]明显下调($P < 0.01$)。在实验组中,Wnt-5a 基因在 3、4 和 4 s 期的表达[光密度值分别为 $(2.13 \pm 0.35) \times 10^5$ 、 $(2.07 \pm 0.44) \times 10^5$ 、 $(1.73 \pm 0.11) \times 10^5$]显著低于 1、2 期[光密度值为 $(2.87 \pm 0.43) \times 10^5$, $P < 0.01$];4 期病例中,Wnt-5a 基因在神经母细胞瘤中的表达低于节细胞性神经母细胞瘤($P < 0.05$)。术前化疗的 3、4 期病例 Wnt-5a 基因的表达[光密度值分别为 $(2.13 \pm 0.35) \times 10^5$ 、 $(2.07 \pm 0.44) \times 10^5$]显著低于良性对照组[光密度值为 $(4.79 \pm 0.75) \times 10^5$, $P < 0.01$],也低于未予化疗的 1、2 期病例[光密度值为 $(2.87 \pm 0.43) \times 10^5$, $P < 0.01$]。**结论** Wnt-5a 基因的表达与肿瘤的临床分期和恶性侵袭程度呈负相关。

【关键词】 神经母细胞瘤;基因表达

Investigation on the Expression of Wnt-5a Gene in Neuroblastoma. LIU Tao¹, HAN Ying¹, ZHU Xiu-dan², et al. 1, Guangzhou Women and Children Medical Center, Guangzhou, 510120, China; 2, Beijing Children's Hospital of Capital Medical University, Beijing, 100045, China

【Abstract】 Objective Wnt-5a gene is a member of the Wnt gene family. Wnt genes play an important role in embryogenesis and oncogenesis. The study aims to detect the expression of Wnt-5a gene at protein level in neuroblastoma, and further investigate the potential association of Wnt-5a gene with clinical stage, pathology classification and chemotherapy. **Methods** 77 neuroblastoma cases were collected for the research. The neuroblastoma cases ($n=43$) and ganglioneuroblastoma cases ($n=19$) were divided into the experimental group and the ganglioneuroma cases ($n=15$) were divided into the control group. The Western blotting method was used to detect the expression of Wnt-5a gene at protein level in tissue samples. We analyzed the results combined with clinical documents and pathologic documents. **Results** The expression of Wnt-5a gene significantly reduced in the experimental group[stage 1, stage 2, stage 3, stage 4 and stage 4s were $(2.87 \pm 0.43) \times 10^5$, $(2.13 \pm 0.35) \times 10^5$, $(2.07 \pm 0.44) \times 10^5$ and $(1.73 \pm 0.11) \times 10^5$ respectively when compared with the control group [$(4.79 \pm 0.75) \times 10^5$] ($P < 0.01$). The expression of Wnt-5a gene in stage 3, stage 4 and stage 4s [$(2.13 \pm 0.35) \times 10^5$, $(2.07 \pm 0.44) \times 10^5$ and $(1.73 \pm 0.11) \times 10^5$ respectively] were lower than stage 1 and stage 2 [$(2.87 \pm 0.43) \times 10^5$] ($P < 0.01$). The expression of Wnt-5a gene in neuroblastoma was lower than in ganglioneuroblastoma in stage 4 ($P < 0.05$). Although the cases completed courses of chemotherapy before surgery, the expression of Wnt-5a gene in stage 3 and stage 4 [$(2.13 \pm 0.35) \times 10^5$ and $(2.07 \pm 0.44) \times 10^5$ respectively] were lower than control group [$(4.79 \pm 0.75) \times 10^5$] and stage 1 and stage 2 [$(2.87 \pm 0.43) \times 10^5$] which were not administrated chemotherapy ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of Wnt-5a gene presents the negative correlation with clinical stage and the tumor's malignancy and invasion.

【Key words】 Neuroblastoma; Gene Expression

神经母细胞瘤 (Neuroblastoma, NB) 是儿童时期最常见的颅外恶性实体瘤, 约占 15 岁以下恶性肿瘤患儿的 7%, 在所有肿瘤病死患儿中约占 15%^[1-2]。Wnt 基因参与胚胎的生长发育, 也与肿瘤的发生发展密切相关^[3-5]。Wnt-5a 基因是 Wnt 基因家族成员之一, 作为胚胎发育的重要调控因子影响祖细胞分化, 也作为抑癌基因阻止和逆转肿瘤的发生^[6-7]。本研究拟从蛋白质表达水平检测各临床分期及不同病理分型神经母细胞瘤 Wnt-5a 基因的表达, 分析化疗对 Wnt-5a 基因表达的影响, 了解 Wnt-5a 基因在神经母细胞瘤中的作用及机制, 为在神经母细胞瘤诊断、治疗及预后判断中的作用提供依据。

材料和方法

一、材料

1. 病理组织标本: 在家长知情同意的基础上, 选取 2003 年 1 月至 2008 年 12 月住院手术治疗的 77 例患儿手术标本, 术后病理检查证实为恶性神经母细胞瘤 (43 例)、节细胞性神经母细胞瘤 (19 例) 和良性神经节细胞瘤 (15 例), 保存于低温 (-80 °C) 冰箱。按照 INSS 分期将神经母细胞瘤和节细胞性神经母细胞瘤分为 1, 2 期、3 期、4 期、4 s 期 4 个实验组别, 以良性神经节细胞瘤作为对照组。

2. 主要试剂和仪器: 一抗: Wnt-5a (H-58) 兔抗人多克隆抗体 (rabbit IgG, Santa Cruz), 二抗: 山羊抗兔 IgG-HRP (Santa Cruz), 蛋白抽提试剂盒 (康成生物公司产品), BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒 (上海博彩生物科技有限公司), alpha 凝胶成像仪 (加拿大), 紫外线可见分光光度仪 (岛津 UV-260, 日本)。

二、方法

1. 标本总蛋白的提取: 按说明书使用蛋白抽提试剂盒提取总蛋白, 将提取好的样品置冰盒冷藏。

2. 样品总蛋白的测定: 按说明书使用 BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒测定所有样品的总蛋白浓度, 并稀释配平, 最终使各样品中蛋白浓度一致。

3. 样品蛋白质电泳并电转移: 分别使用 10% 分离胶和 5% 浓缩胶进行蛋白质电泳, 并将蛋白质转移至硝酸纤维转印膜。

4. Western blotting 免疫检测: 用 5% 脱脂奶粉封闭液封闭硝酸纤维转印膜后, 设置一抗工作浓度为 1:500, 于 4 °C 冰箱孵育过夜, 二抗工作浓度为 1:

4 000, 孵育 1 h, 孵育完成后, 进行化学发光、曝光、显影和定影。

5. 目的蛋白条带分析: 用 alpha 凝胶成像仪分析胶片中的目的蛋白条带, 测定并记录其光密度值。

三、统计学分析

应用 SPSS 11.5 软件包进行统计学分析, 数值以均数 ± 标准差表示, 采用单因素方差分析并进行组间两两比较和两样本比较的秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一、不同临床分期肿瘤组织中 Wnt-5a 基因的表达

与对照组相比, 1, 2, 3, 4 和 4 s 期 Wnt-5a 基因的表达均显著减少 ($P < 0.01$)。3, 4 和 4 s 期 Wnt-5a 基因的表达均显著低于 1, 2 期 ($P < 0.01$), 见表 1、图 1。

表 1 不同分期肿瘤组织中 Wnt-5a 基因的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	光密度值 ($\times 10^5$)
对照组	15	4.79 ± 0.75
1, 2 期	19	2.87 ± 0.43 *
3 期	14	2.13 ± 0.35 **
4 期	22	2.07 ± 0.44 **
4 s 期	7	1.73 ± 0.11 **
F 值		73.88
P 值		0.000

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 1, 2 期比较, ** $P < 0.01$

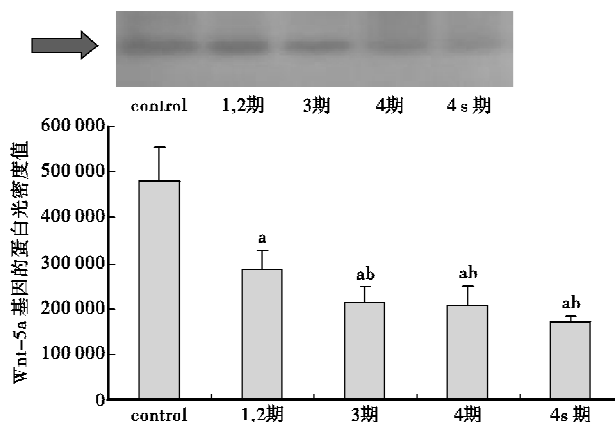


图 1 不同临床分期肿瘤组织中 Wnt-5a 基因的表达情况: 实验组分为 1, 2 期、3 期、4 期和 4 s 期 4 个组别, 以良性神经节细胞瘤为对照组。目的蛋白条带 (箭头所示) 的光密度值即表示 Wnt-5a 基因在肿瘤组织中的蛋白表达量。a 表示与对照组相比, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$); b 表示与 1, 2 期相比, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

二、不同病理分型肿瘤组织中 Wnt-5a 基因的表达

1,2,3 期神经母细胞瘤与节细胞性神经母细胞瘤 Wnt-5a 基因的表达无差异,4 期神经母细胞瘤 Wnt-5a 基因的表达低于节细胞性神经母细胞瘤。

三、术前化疗对肿瘤组织中 Wnt-5a 基因表达的影响

术前化疗的 3,4 期肿瘤 Wnt-5a 基因的表达显著低于良性对照组 ($P < 0.01$),也低于术前未化疗的 1,2 期肿瘤 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 术前化疗对 Wnt-5a 基因表达 ($\bar{x} \pm s$) 的影响

组别	术前化疗		术前未化疗	
	例数	光密度值 ($\times 10^5$)	例数	光密度值 ($\times 10^5$)
对照组	—	—	15	4.79 \pm 0.75
1,2 期	3	2.87	16	2.87 \pm 0.44
3 期	13	2.13 \pm 0.35 [*]	1	2.05
4 期	21	2.07 \pm 0.44 [*]	1	2.02
4s 期	3	1.73	4	1.72
F 值				84.665
P 值				0.000

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与术前未化疗的 1,2 期比较,[#] $P < 0.01$ 。

讨 论

一、Wnt-5a 基因表达与神经母细胞瘤存在高度的相关性

Wnt-5a 基因是 Wnt 基因家族之一,定位于 3p14 ~ p21, mRNA 长度是 5855bp,含有 5 个外显子,人 Frizzled-5(hFz5)是 Wnt-5a 配体的受体。神经母细胞瘤是源于交感神经链和肾上腺髓质神经嵴的恶性肿瘤,可发生在交感神经系统的任何部位^[1]。Wnt-5a 基因是胚胎发育的重要调节因子,调节祖细胞的分化、发育;同时参与神经嵴的分化、发育,可作为抑癌基因阻止、逆转肿瘤的发生^[3-4];Blanc 等在裸鼠模型的神经母细胞瘤组织中发现了 Wnt-5a 基因蛋白水平的表达,且在转移瘤中的表达高度下调;而在神经母细胞瘤患儿的肿瘤组织中发现了 Wnt-5a 基因 mRNA 的表达^[8-9]。提示 Wnt-5a 基因可能在神经母细胞瘤的发生、发展中起重要的作用,可能与肿瘤的转移、恶性侵袭程度存在高度相关性。本实验进一步证实了 Wnt-5a 基因在神经母细胞瘤中存在表达。Wnt-5a 基因通过非经典途径 Wnt/Ca²⁺ 信号通路实现功能调控,其致肿瘤机制可

能是细胞间的相互作用发生了转变。现分析不同临床分期、不同病理分型的神经母细胞瘤由于瘤细胞的异常致临床转归及预后的差异性变化。

研究表明 Wnt-5a 基因的表达与肿瘤的临床分期和恶性侵袭程度呈负相关。3 期和 4 期中 Wnt-5a 基因的表达无显著差异,提示其恶性程度类似,在治疗和预后判断方面要给予同样权重的考虑。同时发现 Wnt-5a 基因的表达在 4s 期为各组中最低,分析可能是由于 3,4 期病例均予术前化疗,而 4s 期总病例数和术前化疗病例数较少,出现较大的统计误差,同时也推测 Wnt-5a 基因可能不是 4s 期神经母细胞瘤自然消退的相关基因。

按病理分型将神经母细胞瘤分为 3 种:神经母细胞瘤、节细胞性神经母细胞瘤和神经节细胞瘤。神经母细胞瘤是未分化肿瘤,可分为未分化型、低分化型和分化型三种亚型,恶性程度高;神经节细胞瘤属良性肿瘤;节细胞性神经母细胞瘤属于混合性肿瘤,内含分化成熟和不成熟成分,可分为结节型、混杂型和边界型,一般认为恶性程度介于神经节细胞瘤和神经母细胞瘤之间^[10-13]。1,2 期和 3 期神经母细胞瘤和节细胞性神经母细胞瘤之间 Wnt-5a 基因的表达无显著差异;4 期神经母细胞瘤和节细胞性神经母细胞瘤之间 Wnt-5a 基因的表达有显著性差异,表明在无转移的原发肿瘤中,Wnt-5a 基因的表达可能与病理组织分型关系不大;但在发生转移的原发肿瘤中,不同的病理组织分型 Wnt-5a 基因的表达呈现差异性变化,且恶性成分多的神经母细胞瘤的表达低于恶性成分较少的节细胞性神经母细胞瘤的表达。若给予同样的治疗干预,Wnt-5a 基因的表达及肿瘤的预后会发生哪些具体的相关改变尚待进一步阐明。关于 Wnt-5a 基因上下游分子参与具体的信号调控,瘤细胞发生相关变化以及对 NMYC 基因的影响,有待进一步的研究。

二、化疗对 Wnt-5a 基因表达的影响

体外实验证实,维甲酸能够抑制神经母细胞瘤株的细胞生长和形态学上的分化^[14-15]。Blanc 等发现给予维甲酸诱导神经母细胞瘤细胞株后,Wnt-5a 基因的表达升高;仅转染 Wnt-5a 基因不能诱导瘤细胞分化,但在转染 Wnt-5a 基因的同时给予维甲酸治疗,发现瘤细胞中 Wnt-5a 基因表达升高的同时,MYCN 基因表达下降^[8-9]。Matthay 等^[16]发现在完成巩固治疗(包括清髓性化疗、全身放疗和自体骨髓移植)后,仅给予维甲酸的后续治疗能够显著改善总体生存率。初次研究给予足疗程的规范化

疗是否可以在抑制肿瘤生长、促进肿瘤细胞向正常分化的同时,还能使肿瘤中 Wnt-5a 基因的表达上调。本研究结果显示尽管给予术前化疗,晚期病例(3 期、4 期) Wnt-5a 基因的表达仍显著低于早期病例(1,2 期),化疗未能使肿瘤中 Wnt-5a 基因的表达上调。临床中对于晚期病例,尽管给予足疗程的强化疗并多次骨髓移植,其总体生存率仍不满意^[17]。对于化疗与 Wnt-5a 基因表达的具体关联作用仍需进一步研究;同时关于如何提高晚期病例的远期预后,仍需寻找新的治疗途径。

参考文献

- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, et al. Neuroblastoma[J]. *Lancet*, 2007, 369(9579): 2106-2120.
- Ishola TA, Chung DH. Neuroblastoma[J]. *Surg Oncol*, 2007, 16(3): 149-156.
- Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(24): 3286-3305.
- Silhankova M, Korswagen HC. Migration of neuronal cells along the anterior-posterior body axis of *C. elegans*: Wnts are in control[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(4): 320-325.
- Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis-a look outside the nucleus[J]. *Science*, 2000, 287(5458): 1606-1609.
- Huguet EL, Smith K, Bicknell R, et al. Regulation of Wnt-5a mRNA expression in human mammary epithelial cells by cell shape, confluence and hepatocyte growth factor[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(21): 12851-12856.
- Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, et al. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo[J]. *Development*, 1999, 126(6): 1211-1223.
- Blanc E, Roux GL, Bénard J, et al. Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma[J]. *Oncogene*, 2005, 24(7): 1277-1283.
- Blanc E, Goldschneider D, Douc-Rasy S, et al. Wnt-5a gene expression in malignant human neuroblasts[J]. *Cancer Lett*, 2005, 228(1-2): 117-223.
- Joshi VV, Silverman JF. Pathology of neuroblastic tumors[J]. *Semin Diagn Pathol*, 1994, 11(2): 107-117.
- Hicks MJ, Mackay B. Comparison of ultrastructural features among neuroblastic tumors: maturation from neuroblastoma to ganglioneuroma[J]. *Ultrastruct Pathol*, 1995, 19(4): 311-322.
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system)[J]. *Cancer*, 1999, 86(2): 364-372.
- Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, et al. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular[J]. *Cancer*, 2003, 98(10): 2274-2281.
- Sidell N, Altman A, Haussler MR, et al. Effects of retinoic acid(RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines[J]. *Exp Cell Res*, 1983, 148(1): 21-30.
- Reynolds CP, Matthay KK, Villablanca JG, et al. Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma[J]. *Cancer Lett*, 2003, 197(1-2): 185-192.
- Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(7): 1007-1013.
- Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology [M]. Fifth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2006: 933-970.
- (上接第 332 页)
- liquid chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization and tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(9): 1130-1138.
- Wang JX, Wang L. Application of serum protein fingerprint model and support vector machine in diagnosis of thyroid cancer[J]. *Zhonghua Yixue Zazhi*, 2006, 11: 86(14): 979-982.
- 王家祥, 陈新让. 肾母细胞瘤血清蛋白质标记物检测与分期模型构建研究[J]. *中华小儿外科杂志*, 2007, 28(2): 90-94.
- Wang XD, Wang JQ. A survey on support vector machines training and testing algorithms Computer engineering and application, 2004, 13: 75-79.
- Improved Prediction of Protein-Protein Binding Sites Using a Support Vector Machines Approach Bioinformatics Advance Access, December 21, 2004