

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00265

Wnt5a 在胰腺癌及癌前病变中的表达差异分析

王 伟^{1△}, 满晓华^{1△}, 郑建明², 李兆申^{1*}, 高 军¹, 龚燕芳¹

1. 第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的** 检测 Wnt5a 基因在不同胰腺组织中的蛋白表达水平, 探讨其在胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)发生中的作用, 为胰腺癌的早期诊疗提供新线索。 **方法** 免疫组化 SP 法检测 Wnt5a 在 21 灶正常胰腺导管(normal pancreatic duct, NP)、73 灶胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)-1、29 灶 PanIN-2、16 灶 PanIN-3、20 例胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN)腺瘤(IPMN-adenoma, IPMA)、13 例 IPMN 交界瘤(IPMN-borderline, IPMB)、19 例 IPMN 黏液癌(IPMN-carcinoma, IPCM)及 50 例 PDAC 组织中的蛋白表达。分析 Wnt5a 的表达与 PDAC 患者临床病理特征及患者术后生存期的关系。 **结果** 随着组织病变级别升高, Wnt5a 表达逐渐增强, 各组 Wnt5a 的免疫组化评分分别为 NP (0)、PanIN-1 (1.90±1.192)、PanIN-2 (3.03±1.322)、PanIN-3 (4.88±1.455)、IPMA (1.40±0.940)、IPMB (2.62±1.502)、IPMC (3.00±1.374)、PDAC (3.11±2.635)。Wnt5a 的表达与肿瘤的增殖活性、远处转移、TNM 分期及患者术后生存期相关($P<0.05$), Wnt5a 高表达组、低表达组的中位生存期分别为 15 个月和 21 个月($P=0.015$)。 **结论** Wnt5a 参与了 PDAC 的发生、发展; Wnt5a 表达增强是 PDAC 的早期事件; Wnt5a 的持续表达和过度表达影响了胰腺癌的增殖、侵袭和转移过程, 并预示患者预后不良。

[关键词] 胰腺导管腺癌; 胰腺上皮内瘤变; 导管内乳头状黏液性肿瘤; Wnt5a

[中图分类号] R 735.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)03-0265-05

Different expressions of Wnt5a in pancreatic cancer and precancerous lesions

WANG Wei^{1△}, MAN Xiao-hua^{1△}, ZHENG Jian-ming², LI Zhao-shen^{1*}, GAO Jun¹, GONG Yan-fang¹

1. Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression of Wnt5a protein in different pancreatic tissues and to evaluate the role of Wnt5a in the carcinogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), so as to provide new clues for the diagnosis and treatment of pancreatic cancer. **Methods** Immunohistochemical SP method was used to examine the expressions of Wnt5a protein in 21 normal pancreatic duct tissues, 73 pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)-1 tissues, 29 PanIN-2, 16 PanIN-3 tissues, 20 intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) adenoma (IPMA) tissues, 13 IPMN-borderline (IPMB) tissues, 19 IPMN-carcinoma (IPMC) tissues and 50 PDAC tissues. The correlation of Wnt5a expression with clinicopathologic characteristics and postoperative survival of PDAC patients was analyzed. **Results** Wnt5a expression increased with the progression of the lesions in the following order: NP(0)→PanIN-1(1.90±1.192)→PanIN-2(3.03±1.322)→PanIN-3(4.88±1.455) or NP(0)→IPMA(1.40±0.940)→IPMB (2.62±1.502)→IPMC (3.00±1.374), and PDAC(3.11±2.635). Wnt5a expression was significantly correlated with tumor proliferation activity, distant metastasis, TNM staging and postoperative survival ($P<0.05$). The median survival periods of PDAC patients with high and low Wnt5 expression were 15 months and 21 months, respectively ($P=0.015$). **Conclusion** Wnt5a is involved in the development and progression of PDAC. Enhancement of Wnt5a expression is an early event in PDAC; sustained or over-expression of Wnt5a may affect the proliferation, invasion and metastases of pancreatic cancer cells, and may indicate a poor prognosis.

[收稿日期] 2011-11-26 **[接受日期]** 2012-02-15

[基金项目] 国家自然科学基金重大国际合作项目(30910103911). Supported by Major International(Regional) Joint Research Program of National Natural Science Foundation of China(30910103911).

[作者简介] 王 伟, 博士, 主治医师. E-mail: smmuww1981@163.com; 满晓华, 主管技师. E-mail: xiaohua73781@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873241, E-mail: zhshi@81890.net

[Key words] pancreatic ductal adenocarcinoma; pancreatic intraepithelial neoplasia; intraductal papillary mucinous neoplasm; Wnt5a

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(3): 265-269]

Wnt 信号通路是近年来肿瘤研究中的热点。Wnt5a 是 Wnt 家族的重要成员,它既能介导经典的 Wnt/ β -catenin 通路,又可启动非经典的 Wnt/ Ca^{2+} 通路,与多种恶性肿瘤的发生密切相关^[1-2]。目前关于 Wnt5a 在胰腺癌发生、发展中的作用的研究结果并不一致。Iozzo 等^[3]发现 Wnt5a 在大多数恶性肿瘤中上调,在胰腺癌中则下调。而 Ripka 等^[4]认为, Wnt5a 增强了胰腺癌细胞的增殖、侵袭和转移活性, Wnt5a/ β -catenin 参与了胰腺癌细胞的上皮间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)过程。为进一步研究 Wnt5a 在胰腺癌发病中的作用,本研究通过免疫组化(immunohistochemistry, IHC)方法检测 Wnt5a 在正常胰腺导管(normal pancreatic duct, NP),胰腺癌癌前病变[胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)、胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN)]及胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)中的蛋白表达,分析其与胰腺癌临床病理特征之间的关系,探讨 Wnt5a 在胰腺癌发生、发展中的作用,从而为胰腺癌的发病机制及临床诊疗研究提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 胰腺组织标本来源 收集 2001 年至 2010 年我院的胰腺组织标本,其中 NP 12 例(尸检 9 例、胰腺外伤 1 例、脾亢 1 例、异位胰腺 1 例;21 灶)、IPMN 52 例[20 例 IPMN 腺瘤(IPMA)、13 例 IPMN 交界瘤(IPMB)、19 例 IPMN 黏液癌(IPMC)];另从我院病理科获赠胰腺癌组织芯片 1 片、PanIN 芯片 3 片。胰腺癌组织芯片共计 198 个组织点,包含病例及随访资料完整的 PDAC 50 例;3 张 PanIN 芯片共计 466 个组织点,包含 PanIN 共 118 灶, PanIN-1、PanIN-2、PanIN-3 分别为 73、29 和 16 灶。PanIN 与 IPMN 的分级诊断参照文献[5-6]。

1.2 IHC 染色及评定标准 组织标本常规石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片,使用鼠抗人单克隆 Wnt5a 抗体(Abcam, ab72583)行 SP 法 IHC 染色。NP、PanIN 仅统计导管上皮细胞及其阳性细胞数,IPMN 统

计导管内细胞及其阳性细胞数,每例标本至少随机观察 5~10 个高倍视野(10 \times 40 倍)。IHC 结果以阳性细胞数及染色强度判定:阳性细胞数 $<$ 25%记 1 分,25%~50%记 2 分,50%~75%记 3 分, $>$ 75%记 4 分;无染色记 0 分,弱阳性记 1 分,中等阳性记 2 分,强阳性记 3 分。两者的乘积作为每例标本的 IHC 评分(IHC score, IHCS)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,不同病变组间 Wnt5a 的 IHCS 比较采用单因素方差分析;Wnt5a 的表达与临床病理特征关系的分析采用 χ^2 检验;Wnt5a 的表达与患者生存期的关系采用 Kaplan-Meier 法并行 Log-rank 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 Wnt5a 在 PanIN 组织中的表达 Wnt5a 在 NP 上皮细胞中为阴性表达,在 PanIN-1A 组织中开始出现弱阳性表达,主要表现为细胞核或细胞质染色,细胞膜均不着色;随着组织异型程度增加, Wnt5a 表达逐渐增强(图 1A~1E), PanIN 各组(PanIN-1、PanIN-2、PanIN-3) Wnt5a 的 IHCS 分别为 1.90 ± 1.192 、 3.03 ± 1.322 和 4.88 ± 1.455 , 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$); Wnt5a 在 PDAC 中的 IHCS(3.11 ± 2.635)较 PanIN-1 组升高($P < 0.05$),但较 PanIN-3 组有所降低($P < 0.05$)。

2.2 Wnt5a 在 IPMN 组织中的表达 与在 PanIN 组织中的表达类似, Wnt5a 在低级别病变 IPMA 中开始出现弱阳性表达,随着组织异型程度增加, Wnt5a 表达逐渐增强(图 1F~1I), 各组 Wnt5a 的 IHCS 分别为 IPMA (1.40 ± 0.940)、IPMB (2.62 ± 1.502)、IPMC (3.00 ± 1.374), 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$); Wnt5a 的 IHCS 在 IPMC 与 PDAC (3.11 ± 2.635)间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 Wnt5a 的表达与胰腺癌临床病理特征及患者术后生存期的关系 收集了 50 例 PDAC 患者的临床病理资料(表 1),主要包括患者年龄、性别、肿瘤大小和部位、神经浸润、血管浸润、分化程度、增殖活

性、T分期、淋巴转移、远处转移及 TNM 分期(国际胰腺癌 TNM 分期, UICC2002 年标准)。

PDAC 中 Wnt5a 的 IHCS 第 75 百分位数(P_{75})为 4, 选取 $P_{75}=4$ 作为 Wnt5a 表达高低的临界值, 结

果发现 Wnt5a 的表达与肿瘤的增殖活度、远处转移、TNM 分期有关($P<0.05$), 而与患者年龄、性别、肿瘤部位和大小、神经浸润、血管浸润、分化程度、T 分期、淋巴转移无关($P>0.05$, 表 1)。

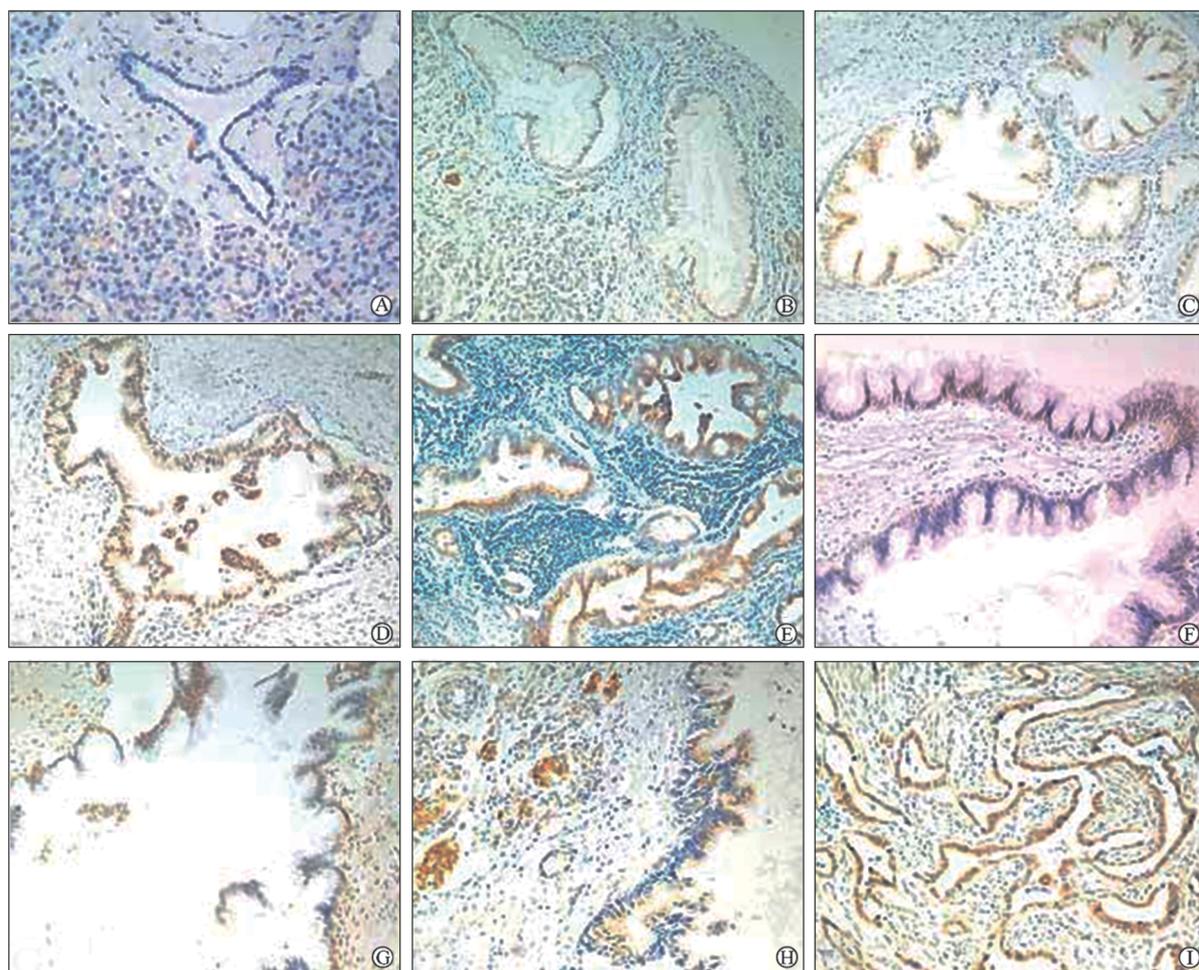


图 1 Wnt5a 在不同胰腺组织中的表达

Fig 1 Expression of Wnt5a protein in different pancreatic tissues

A: Normal pancreatic duct; B: Pancreatic intraepithelial neoplasia(PanIN) 1A; C: PanIN-1B; D: PanIN-2; E: PanIN-3; F: Intraductal papillary mucinous neoplasia(IPMN)-adenoma; G: IPMN-borderline; H: IPMN-carcinoma; I: Pancreatic ductal adenocarcinoma. Original magnification: $\times 400$ (A); $\times 200$ (B-I)

对这 50 例 PDAC 患者进行了随访, 并计算术后生存期, 结果表明: Wnt5a 的表达与患者的生存期显著相关, Wnt5a 高表达组的中位生存期为 15 个月, 95%CI 为(10.596, 19.404)个月; 而低表达组的中位生存期为 21 个月, 95%CI 为(15.041, 26.959)个月($P=0.015$, 图 2)。

3 讨论

Wnt 信号转导通路是近年来肿瘤研究中的热点, 它不仅在正常胚胎发育中发挥重要作用, 参与调节细胞生长、迁移和分化, 调控正常组织重建及干细

胞增殖^[7-9], 而且其异常活化与多种人类肿瘤的发生、发展密切相关^[10]。Wnt 信号转导通路的很多成分在进化上都非常保守, 目前已发现 19 种人类 Wnt 基因, 并已证实了 Wnt 通路的 3 条主要分支: (1) Wnt/ β -catenin 经典信号通路, 该通路由 β -catenin/T 细胞因子(T cell factor, TCF)调节 Wnt 靶基因的表达^[11-12]; (2) planar 细胞极性(planar cell polarity, PCP)通路, 该通路主要调控细胞骨架的重排, 建立不对称的细胞极性, 协调细胞形态的改变和细胞运动^[13]; (3) Wnt/ Ca^{2+} 通路, 该通路调节细胞黏附和细胞活力^[14]。

表1 Wnt5a 的表达与胰腺癌临床病理特征的关系

Tab 1 Correlation of Wnt5a expression with clinicopathologic features of pancreatic cancer

Characteristics	N	Wnt5a expression ^a		P
		Low (n=37)	High (n=13)	
Age(year) ^b				0.904
<60	18	14	4	
≥60	32	23	9	
Gender				0.424
Male	26	18	8	
Female	24	19	5	
Tumor location				0.298
Head	38	30	8	
Body and tail	12	7	5	
Tumor size d/cm				1
<4	18	13	5	
≥4	32	24	8	
Nerve infiltration				0.856
Yes	28	21	7	
No	22	16	6	
Vessel infiltration				0.424
Yes	24	19	5	
No	26	18	8	
Differentiation				0.769
Well	11	9	2	
Moderate	31	22	9	
Poor	8	6	2	
Proliferative activity				0.029
High	18	10	8	
Moderate	16	12	4	
Low	16	15	1	
Tumor stage ^c				0.835
T2	11	8	3	
T3	30	23	7	
T4	9	6	3	
Lymphatic metastasis				0.351
No	44	34	10	
Yes	6	3	3	
Distant metastasis				0.031
No	46	36	10	
Yes	4	1	3	
TNM stage				0.04
I + II	39	32	7	
III + IV	11	5	6	

^a: The 75th percentile of Wnt5a IHCS was the cut-off point for high or low expression; ^b: Age was (60.78 ± 11.872) years old, ranging 18-74 years old; ^c: Union for International Cancer Control (UICC) 2002. IHCS: Immunohistochemistry score

作为 Wnt 家族成员, Wnt5a 既能活化经典的 Wnt/ β -catenin 通路又能活化非经典的 Wnt/ Ca^{2+} 通路^[1-2], 参与了多种人类肿瘤的发生发展。但是, 目前关于 Wnt5a 在肿瘤中生物学作用的认识尚存在较大分歧。

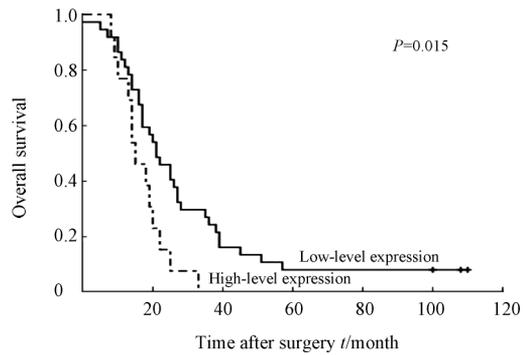


图2 Wnt5a 的表达与胰腺癌患者术后生存期的关系

Fig 2 Correlation between Wnt5a expression levels and patient survival

The 75th percentile of Wnt5a IHCS was the cut-off point for high or low expression. IHCS: Immunohistochemistry score

有研究表明, Wnt5a 具有癌基因的特性, Wnt5a 持续表达或过度表达可以影响肿瘤细胞的增殖、分化与侵袭转移过程。Iozzo 等^[3]研究发现, 在肺、乳腺、前列腺及黑素瘤组织中存在 Wnt5a mRNA 的过度表达。Christiansen 等^[15]报道, 在胚胎发育过程中黑素细胞内 Wnt5a 表达增加容易导致细胞发生恶性转化。Weeraratna 等^[16]发现, 经转染后过度表达 Wnt5a 的黑素瘤细胞运动能力明显增加。王卫星等^[17]报道 Wnt5a 低表达可显著抑制肺鳞癌细胞的迁移和侵袭能力。然而, 也有研究认为 Wnt5a 具有抑癌基因的特性, 它能够减少或延缓肿瘤的发生与转移。Liang 等^[18]报道, Wnt5a 在造血系统肿瘤中可能发挥抑癌功能。Dejmek 等^[19]研究发现, Wnt5a 阴性表达的 Dukes 结肠癌患者生存时间较阳性患者显著缩短。Leris 等^[20]研究发现, Wnt5a 在乳腺癌组织中表达低于正常乳腺组织, 并且在转移瘤组织中表达更低。以上研究表明 Wnt5a 在不同肿瘤中的作用机制并不相同。

为进一步研究 Wnt5a 在 PDAC 发病中的作用, 本研究采用 IHC 方法检测 Wnt5a 蛋白在正常胰腺、胰腺癌组织及胰腺癌早期病变 PanIN 和 IPMN 导管中的表达, 并分析了 Wnt5a 表达水平与胰腺癌临床病理特征的相关性。结果表明, Wnt5a 在 PanIN、IPMN 中均随病变级别增加而表达逐渐增强, 这与 Ripka 等^[4]的研究结果一致, 说明 Wnt5a 表达增强是 PDAC 发生的早期事件, 并且参与了 PDAC 进展的全过程。另外, 在比较 PDAC 组与 PanIN-3 组中 Wnt5a 的表达水平时发现, Wnt5a 在 PDAC 组中的

平均表达水平有所降低,这可能与肿瘤组织的差异性有关。实验结果表明,Wnt5a在部分肿瘤组织中呈现高表达,而在部分肿瘤中呈现明显的低表达,体现出了胰腺肿瘤的个体差异性。因此,我们进一步分析了Wnt5a的表达与胰腺癌临床病理特征的相关性,Wnt5a的高表达与肿瘤的增殖活度、远处转移、TNM分期显著相关。细胞增殖活性越强,Wnt5a阳性评分越高;发生远处转移及TNM分期较高(Ⅲ+Ⅳ)的病例Wnt5a阳性评分较高,提示Wnt5a过度表达可以影响肿瘤细胞的增殖及侵袭与转移过程。同时,我们比较了Wnt5a高表达与低表达组患者的生存期,结果发现Wnt5a与患者预后显著相关,Wnt5a高表达组的中位生存期低于低表达组(15个月 vs 21个月),提示Wnt5a高表达预示患者预后不良。

综上所述,本研究结果证实Wnt5a参与了PDAC的发生、发展;Wnt5a表达增强是PDAC的早期事件,其表达增强最早可见于PanIN-1和IP-MA;Wnt5a的持续表达和过度表达影响了胰腺癌的增殖、侵袭和转移过程,并预示患者预后不良。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Kühl M. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements[J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 967-974.

[2] Prieve M G, Moon R T. Stromelysin-1 and mesothelin are differentially regulated by Wnt-5a and Wnt-1 in C57mg mouse mammary epithelial cells[J]. *BMC Dev Biol*, 2003, 3: 2.

[3] Iozzo R V, Eichstetter I, Danielson K G. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy[J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 3495-3499.

[4] Ripka S, König A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Klöppel G, et al. WNT5A-target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 1178-1187.

[5] 郑建明,朱明华. 胰腺上皮内瘤变[J]. *胰腺病学*, 2004, 4: 116-120.

[6] Tanaka M, Chari S, Adsay V, Fernandez-del Castillo C, Falconi M, Shimizu M, et al. International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and

mucinous cystic neoplasms of the pancreas[J]. *Pancreatol*, 2006, 6(1-2): 17-32.

[7] Logan C Y, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 781-810.

[8] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease[J]. *Cell*, 2006, 127: 469-480.

[9] Bryja V, Cajánek L, Grahn A, Schulte G. Inhibition of endocytosis blocks Wnt signalling to beta-catenin by promoting dishevelled degradation[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2007, 190: 55-61.

[10] Polakis P. Wnt signaling and cancer[J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 1837-1851.

[11] Moon R T, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin[J]. *Science*, 2002, 296: 1644-1646.

[12] Akiyama T. Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000, 11: 273-282.

[13] Mlodzik M. Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate Drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation? [J]. *Trends Genet*, 2002, 18: 564-571.

[14] Kühl M, Sheldahl L C, Park M, Miller J R, Moon R T. The Wnt/ Ca^{2+} pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape[J]. *Trends Genet*, 2000, 16: 279-283.

[15] Christiansen J H, Coles E G, Wilkinson D G. Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12: 719-724.

[16] Weeraratna A T, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma[J]. *Cancer Cell*, 2002, 1: 279-288.

[17] 王卫星,毛燕君,杨继金. Wnt5a表达沉默抑制肺鳞癌细胞 SK-MES-1 迁移及侵袭[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 626-629.

Wang W X, Mao Y J, Yang J J. Silence of Wnt5a gene inhibits migration and invasion of lung squamous carcinoma cells[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29: 626-629.

[18] Liang H, Chen Q, Coles A H, Anderson S J, Pihan G, Bradley A, et al. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4: 349-360.

[19] Dejmek J, Dejmek A, Säfholm A, Sjölander A, Andersson T. Wnt-5a protein expression in primary duks B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 9142-9146.

[20] Leris A C, Roberts T R, Jiang W G, Newbold R F, Mokbel K. WNT5A expression in human breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(2A): 731-734.

[本文编辑] 商素芳