

# Wnt5a 在宫颈鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

平 静, 田 杰, 范菊花, 刘兰甜, 周东华, 邓凯贤  
(佛山市妇幼保健院, 广东 佛山 528000)

**摘 要:** [目的] 探讨 Wnt5a 在宫颈鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义。[方法] 应用原位杂交技术及免疫组化法分别检测 60 例宫颈鳞状细胞癌及癌旁正常宫颈组织 Wnt5a mRNA 和蛋白的表达, 分析 Wnt5a 表达与宫颈鳞状细胞癌临床病理参数的关系。[结果] 宫颈鳞状细胞癌组织 Wnt5a mRNA 及蛋白的阳性表达率分别为 93.3% (56/60) 和 96.7% (58/60), 均明显高于癌旁正常宫颈组织 ( $P < 0.001$ ), 且 Wnt5a mRNA 与蛋白表达呈显著正相关 ( $r_s = 0.323, P < 0.05$ )。Wnt5a mRNA 及蛋白表达与肿瘤组织分化程度、淋巴结转移、浸润深度和临床分期有关 ( $P < 0.05$ ), 与患者年龄、肿瘤直径无关 ( $P > 0.05$ )。[结论] Wnt5a 与宫颈鳞状细胞癌的发生、发展密切相关, 检测其表达情况有可能为评估宫颈鳞状细胞癌的转移潜能和预后提供参考依据。

**关键词:** 宫颈肿瘤; 鳞状细胞癌; Wnt5a; 原位杂交; 免疫组化

**中图分类号:** R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)08-0648-05  
**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.08.B008

## Expression of Wnt5a in Cervical Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance

PING Jing, TIAN Jie, FAN Jv-hua, et al.

(Maternal and Children's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the expression of Wnt5a in squamous cell carcinoma of the cervix and its clinical significance. [Methods] The expression of Wnt5a mRNA and protein was detected by in situ hybridization and immunohistochemistry in 60 cases of squamous cell carcinoma of the cervix, with adjacent normal cervix tissue as control group. The correlation between clinical features and expression of Wnt5a mRNA and protein was analyzed. [Results] The positive rates of Wnt5a mRNA and protein in cervical squamous cell carcinoma were 93.3% (56/60) and 96.7% (58/60), respectively, which were significantly higher than those in normal cervix tissue ( $P < 0.001$ ). The expression of Wnt5a mRNA was significantly correlated with the expression of Wnt5a protein in cervical squamous cell carcinoma ( $r_s = 0.323, P < 0.05$ ). The expression of Wnt5a mRNA and protein was significantly correlated with histological grade, lymph node metastasis, depth of invasion and clinical stage of cervical cancer ( $P < 0.05$ ), but not correlated with age and tumor size ( $P > 0.05$ ). [Conclusion] Wnt5a expression may be closely related to development of squamous cell carcinoma of the cervix and it may provide information for metastatic potential and prognosis of cervical cancer.

**Subject words:** cervical neoplasms; squamous cell carcinoma; Wnt5a; in situ hybridization; immunohistochemistry

宫颈癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一, 在发展中国家其发病率居女性生殖道恶性肿瘤第 1 位<sup>[1]</sup>。Wnt 信号通路参与成体细胞增殖、分化和凋亡过程, 与一些常见人类恶性肿瘤的发生发展、侵袭和转移

密切相关<sup>[2]</sup>。异常的 Wnt 信号转导成为了一些癌症、炎症性疾病发病的重要机制<sup>[3]</sup>。Wnt5a 是 Wnt 家族中的重要成员之一, 通过激活 Wnt/JNK 通路参与细胞生长和分化过程中的信号传递, 既可发挥致癌作用, 也可以发挥抑癌作用, 因此, 针对某种特定肿瘤, 分析其 Wnt5a 表达情况和功能十分必要<sup>[4]</sup>。新近多项肿瘤相关研究显示, Wnt5a 是一个良好的肿瘤侵袭和预后标志物<sup>[5]</sup>, 但其在宫颈鳞状细胞癌组织中

**基金项目:** 广东省佛山市卫生和计划生育局医学科研基金项目(2015298)  
**通讯作者:** 平 静, 主治医师, 硕士; 佛山市妇幼保健院病理科, 广东省佛山市禅城区人民西路 11 号(528000); E-mail: 623061305@qq.com  
**收稿日期:** 2016-03-01; **修回日期:** 2016-03-21

的表达鲜见报道。本实验采用核酸原位杂交技术和免疫组化法分别检测 Wnt5a 基因和蛋白在宫颈鳞状细胞癌和正常宫颈组织中的表达,并分析其与宫颈癌临床病理特征的关系,以期为临床寻找宫颈癌治疗靶点提供理论参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本来源

收集佛山市妇幼保健院病理科 2012 年 1 月至 2015 年 1 月期间的宫颈癌手术切术标本 60 例,每例分别取一块癌组织和癌旁正常宫颈组织(距离癌组织 2.0cm 以上)。患者年龄 28~65 岁,中位年龄 45 岁,所选标本均经病理确诊为鳞状细胞癌,其中高分化 13 例,中~低分化 47 例,临床分期(FIGO2009): I+II 期 50 例,III+IV 期 10 例。所有患者手术前均未行放、化疗或激素等相关治疗。组织标本采用 4% 中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋切片。每个蜡块制作 3 张切片,厚度 5 $\mu$ m,分别行 HE 染色,核酸原位杂交(ISH)检测 Wnt5a mRNA 和免疫组化(IHC)检测 Wnt5a 蛋白表达。

### 1.2 主要试剂

Wnt5a mRNA 原位杂交试剂盒及抗体均购自武汉博士德生物公司。Wnt5a 探针为针对人 Wnt5a 靶基因的寡核苷酸序列(5'-ATGAATAACCCTGTT CAGATGTCAGAAGTATATAT-3';5'-CGCATCCACG CC-AAGGGCTCCTACGAGAGTGCTCG-3';5'-CGGCT CA-ACAGCCGGGCAAGTTGGTACAGGTCAA-3'),经地高辛标记,与靶基因结合后采用异硫氰酸荧光素 FITC 显色。二抗 HRP 鼠兔通用型购自广州安必平医药公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 原位杂交

采用多相寡核苷酸探针和高敏感标记技术,配合使用敏感性加强型的原位检测方法,操作步骤严格按照原位杂交试剂盒说明书进行,每批染色均用已知阳性切片作为阳性对照,用 PBS 代替杂交液作为阴性对照。

#### 1.3.2 免疫组化 HRP 法染色

在枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)中先用微波炉高火加热煮沸 10min,再转至中火 20min 进行抗原修复;

3% $H_2O_2$  溶液中放置 10min;PBS 冲洗 2 次,1min/次;滴加 Wnt5a 抗体(1:200 稀释)4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,以 PBS 代替一抗作为阴性对照;PBS 冲洗 2 次,1min/次;滴加二抗室温孵育 30min;PBS 冲洗 2 次,1min/次;DAB 显色 3min;苏木精复染,盐酸酒精分化,常规脱水、透明、封固,显微镜下观察。

### 1.4 结果判定

Wnt5a mRNA 阳性表达为荧光显微镜下观察到细胞质着色呈黄绿色。Wnt5a 蛋白阳性表达主要为细胞质内出现棕黄色颗粒,判定标准采用双盲法观察结果,以着色强度(A)及阳性细胞比例(B)两项综合评定,A:无阳性着色 0 分,淡黄色阳性颗粒 1 分,棕黄色阳性颗粒 2 分,棕褐色阳性颗粒 3 分。B:随机抽取 5 个高倍视野,计算 100 个细胞阳性百分率,求平均值,阳性细胞数<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,>50%~75%为 3 分,>75%为 4 分。A、B 之和为免疫组化评分,评分 $\leq$ 3 分为阴性,>3 分为阳性。

### 1.5 统计学处理

实验数据采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理,各组间 Wnt5a mRNA 和蛋白表达阳性率差异均采用  $\chi^2$  检验进行分析, $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 原位杂交结果

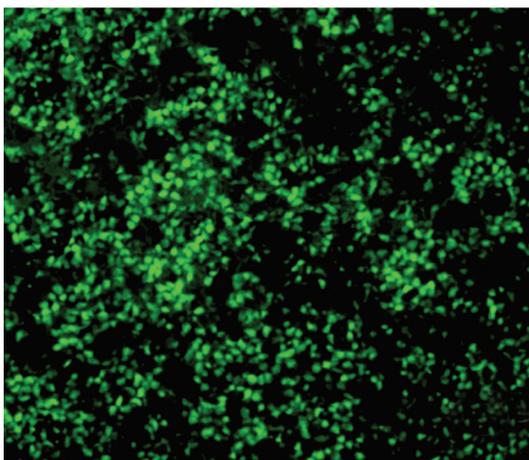
应用原位杂交技术检测结果显示,宫颈鳞状细胞癌组织和相应癌旁正常宫颈组织 Wnt5a mRNA 的阳性表达率分别为 93.3%(56/60)和 6.7%(4/60),Wnt5a mRNA 在宫颈鳞状细胞癌组织中的阳性表达率显著高于癌旁正常宫颈组织( $\chi^2=90.133$ , $P<0.001$ )(Figure 1)。

### 2.2 免疫组织化学结果

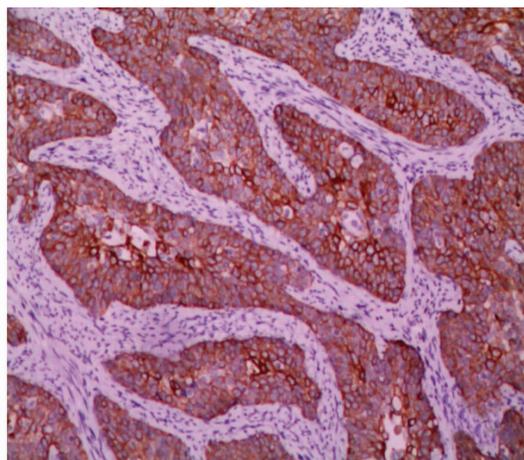
应用免疫组化法检测结果显示,宫颈鳞状细胞癌组织和相应癌旁正常宫颈组织 Wnt5a 蛋白的阳性表达率分别为 96.7%(58/60)和 10.0%(6/60),Wnt5a 蛋白在宫颈鳞状细胞癌组织中的阳性表达率显著高于癌旁正常宫颈组织( $\chi^2=78.190$ , $P<0.001$ )(Figure 2)。

### 2.3 宫颈鳞状细胞癌组织 Wnt5a mRNA 与蛋白表达的相关性

与癌旁正常宫颈组织相比较,60 例宫颈鳞状细



**Figure 1** Positive expression of *Wnt5a* mRNA in squamous cell carcinoma of the cervix (FITC × 100, in situ hybridization)



**Figure 2** Positive expression of *Wnt5a* protein in squamous cell carcinoma of the cervix (HRP × 100, immunohistochemistry)

胞癌组织中 *Wnt5a* mRNA 与蛋白表达的变化趋势相一致,均明显上调,经 Spearman 相关性检验分析,两者表达呈正相关( $r_s=0.323, P<0.05$ )(Table 1)。

**Table 1** The correlation between the expression of *Wnt5a* mRNA and protein

<i>Wnt5a</i> mRNA	N	<i>Wnt5a</i> protein		$r_s$	P
		Positive	Negative		
Positive	56	55	1	0.323	0.012
Negative	4	3	1		
Total	60	58	2		

### 2.4 *Wnt5a* mRNA 及蛋白在宫颈鳞状细胞癌组织中的表达与临床病理特征的关系

*Wnt5a* mRNA 及蛋白表达与宫颈鳞状细胞癌组织分化程度、淋巴结转移、浸润深度和分期有关,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与患者年龄、肿瘤直径无关,差异无统计学意义( $P>0.05$ )(Table 2)。

## 3 讨论

近年来,随着对肿瘤的深入研究,*Wnt* 信号的研究也受到了很高的关注。*Wnt* 信号传导通路包括经典 *Wnt* 通路和非经典 *Wnt*/*JNK* 通路及 *Wnt*/ $Ca^{2+}$  通路,*Wnt*/*JNK* 通路是非经典 *Wnt* 通路中最重要的通路之一。新近研究表明,*Wnt* 信号通路不仅在胚胎发育过程中起至关重要的作用,而且与肿瘤的发生发展也关系密切<sup>[6,7]</sup>。*Wnt* 基因广泛表达于人体多种组织,*Wnt5a* 基因是一种与恶性肿瘤转移潜能有关的

肿瘤转移相关基因,定位在染色体 3P14.2~P21.1<sup>[8]</sup>。*Wnt* 蛋白的调节异常可导致发育、增殖和血管发生异常,最终可引起肿瘤的发生<sup>[9]</sup>。*Wnt5a* 是 *Wnt* 家族的一种分泌型蛋白,编码富含半胱氨酸的生长因子,可影响细胞迁移和血管生成,且对组织修复和组织稳态的维持非常重要<sup>[10]</sup>。*Wnt5a* 可以作为效应因子选择性激活 *Wnt*/*JNK* 通路,进而参与细胞生长和分化过程中的信号传递。*Wnt5a* 主要是通过激活 *Wnt* 非经典途径发挥生物学效应。*Wnt5a* 是研究较多的非经典 *Wnt* 信号传导通路的启动因子,在不同肿瘤中 *Wnt5a* 的作用不尽相同<sup>[11]</sup>。*Wnt5a* 蛋白的作用途径并非由其本身决定,而是在特定的细胞背景下,由相应受体的表达决定。

研究发现 *Wnt5a* 具备很强的癌基因潜质,在很多恶性肿瘤中均有异常的高水平表达<sup>[12]</sup>。*Wnt5a* 在胰腺癌等多种恶性肿瘤中表达上调<sup>[13]</sup>,*Wnt5a* 过表达能提高前列腺癌细胞及恶性黑色素瘤细胞的增殖和侵袭能力<sup>[14,15]</sup>,*Wnt5a* 在乳腺癌中过表达,提示其为促癌因子<sup>[16]</sup>。而在另外一些肿瘤中 *Wnt5a* 则可能发挥抑制肿瘤生长的作用,*Wnt5a* 在卵巢癌组织中表达明显低于正常卵巢组织,提示 *Wnt5a* 可能作为抑癌基因抑制细胞凋亡<sup>[17,18]</sup>。*Wnt5a* 可抑制人肝癌细胞 MHCC97L 的增殖和迁移能力,在肿瘤生长过程中发挥肿瘤抑制基因作用<sup>[19]</sup>。本实验研究通过对比分析宫颈鳞状细胞癌组织及其癌旁正常宫颈组织 *Wnt5a* mRNA 和蛋白表达发现 *Wnt5a* 在癌组织和癌旁正常宫颈组织中均有表达,*Wnt5a* 在癌组织中的阳

**Table 2 The expression of Wnt5a and clinicopathologic parameters**

Variables	N	Wnt5a mRNA				Wnt5a protein			
		Positive	Negative	$\chi^2$	P	Positive	Negative	$\chi^2$	P
Age(years)									
<45	25	22	3	1.959	0.162	24	1	0.059	0.808
≥45	35	34	1			34	1		
Tumor size(cm)									
≤4	48	46	2	2.411	0.121	47	1	1.164	0.281
>4	12	10	2			11	1		
Pathological grading									
I	13	10	3	7.183	0.029	11	2	7.480	0.044
II~III	47	46	1			47	0		
Myometrial invasion									
<1/2	51	50	1	12.101	0.009	51	0	11.724	0.020
≥1/2	9	6	3			7	2		
Lymph node metastasis									
Yes	49	48	1	9.192	0.017	49	0	9.216	0.031
No	11	8	3			9	2		
FIGO stage									
I+II	50	49	1	10.500	0.013	50	0	10.345	0.025
III+IV	10	7	3			8	2		

性率显著高于癌旁正常宫颈组织，且 Wnt5a mRNA 与蛋白表达呈显著正相关( $r_s=0.323, P<0.05$ )。另外，通过对癌组织 Wnt5a mRNA 和蛋白表达的阳性率与患者临床病理特征进行相关性分析发现，Wnt5a mRNA 和蛋白表达与宫颈鳞状细胞癌组织分化程度、淋巴结转移、浸润深度和临床分期有关( $P<0.05$ )，而与患者年龄、肿瘤直径无关( $P>0.05$ )。以上实验结果提示 Wnt5a 在宫颈鳞状细胞癌的发生发展过程中可能起到促癌的作用。Wnt5a 发挥促癌作用的机制可能与激活 Wnt/JNK 非经典信号通路有关，Wnt5a 蛋白表达通过非经典通路途径介导细胞的粘附和迁移，使肿瘤更富侵袭性。除此之外，近几年有学者提出  $\beta$ -catenin 和 E-cadherin 是参与 Wnt 通路在细胞内信号传导的关键因子<sup>[20]</sup>，Wnt5a 与  $\beta$ -catenin 和 E-cadherin 之间的相互作用在宫颈癌进展中的机制有待进一步研究证实。

综上所述，本实验研究提示 Wnt5a 可能参与了宫颈鳞状细胞癌的发生、发展过程，尤其是宫颈鳞状细胞癌的浸润、转移过程。因此，寻找一个能阻碍其作用的分子，有望成为抑制宫颈鳞状细胞癌浸润和转移的新方法。深入研究 Wnt5a 与宫颈鳞状细胞癌临床病理特征的关系，也将为指导宫颈癌的治疗和预后评估提供理论参考依据。Wnt5a 作为 Wnt 家族中的重要成员，是肿瘤发生、发展过程中的关键因

子，但是对于 Wnt5a 发挥作用的具体机制尚未明确。

### 参考文献：

- [1] Yang GC, Yu LB, Wang YX, et al. Expression of NOB1 in cervical squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. Journal of Chinese Oncology, 2014, 20(12):990-993. [杨桂春, 于丽波, 王玉霞, 等. NOB1 在宫颈鳞癌中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(12):990-993.]
- [2] Delaunay D, Cortay V, Patti D, et al. Mitotic spindle asymmetry: a Wnt/PCP-regulated mechanism generating asymmetrical division in cortical precursors [J]. Cell Rep, 2014, 6(2):400-414.
- [3] Nishita M, Enomoto M, Yamagata K, et al. Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(6):346-354.
- [4] Yuan Y, Niu CC, Deng G, et al. The Wnt5a/Ror2 non-canonical signaling pathway inhibits canonical Wnt signaling in K562 cells[J]. Int J Mol Med, 2011, 27(1):63-69.
- [5] Li HY. Wnt-5a signal transduction and tumor [J]. Biotech World, 2015, 10(7):11. [李宏悦. Wnt-5a 信号转导与肿瘤[J]. 生物技术世界, 2015, 10(7):11.]
- [6] Wei W, Sun HH, Li N, et al. Wnt5a modulates cell cycle progression and contributes to the chemoresistance in pancreatic cancer cells[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,

- 2014, 13(5):529-538.
- [7] Murdoch CE, Bachschmid MM, Matsui R. Regulation of neovascularization by S-glutathionylation via the Wnt5a/sFlt-1 pathway[J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(6): 1665-1670.
- [8] Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, et al. Wnt5a: its signaling, functions and implication in a diseases [J]. *Acta physiol (Oxf)*, 2012, 204(1): 17-33.
- [9] Hu XC, Xu JJ, Yu DL, et al. Role and mechanism of Wnt5a regulating proliferation and epithelial mesenchymal transition in A549 spheres [J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2014, 36(18): 1890-1894. [胡欣春, 徐建军, 喻东亮, 等. Wnt5a 在肺癌 A549 细胞球增殖和上皮间质转化中的作用及机制研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(18): 1890-1894.]
- [10] Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease [J]. *Cell*, 2012, 149 (6): 1192-1205.
- [11] Bauer M, Bénard J, Gaasterland T, et al. WNT5A encodes two isoforms with distinct functions in cancers [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80526.
- [12] Zhang ZY, Zhang JX, Fu AJ, et al. Abnormal expression of non-canonical Wnt pathway Wnt5a mediated in gliomas [J]. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2013, 12(11): 819-821. [张志勇, 张晋霞, 付爱军, 等. 胶质瘤中 Wnt5a 介导的非经典 Wnt 通路的异常表达 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2013, 12(11): 819-821.]
- [13] Bo H, Zhang S, Gao L, et al. Upregulation of Wnt5a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(1): 496.
- [14] Yamamoto H, Oue N, Sato A, et al. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase [J]. *Oncogene*, 2010, 29 (14): 2036-2046.
- [15] Webster MR, Xu M, Kinzler KA, et al. Wnt5A promotes an adaptive, senescent-like stress response, while continuing to drive invasion in melanoma cells [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2015, 28(2): 184-195.
- [16] Zhu Y, Tian Y, Du J, et al. Dvl2-dependent activation of Daam1 and RhoA regulates Wnt5a-induced breast cancer cell migration [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37823.
- [17] Bitler BG, Nicodemus JP, Li H, et al. Wnt5a suppresses epithelial ovarian cancer by promoting cellular senescence [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(19): 6184-6194.
- [18] Song YH, Jin P, Ma YH. Expression of Fascin and Wnt5a in epithelial ovarian cancer and their correlation [J]. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2014, 41(10): 1107-1110. [宋易航, 金平, 马艺辉. 卵巢上皮性癌中 Fascin 和 Wnt5a 的表达及其相关性 [J]. *肿瘤防治研究*, 2014, 41(10): 1107-1110.]
- [19] Bi LQ, Liu XH, Chen YJ, et al. Wnt5a gene affects cell proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2012, 28(8): 857-861. [毕利泉, 刘晓红, 陈英剑, 等. Wnt5a 基因对肝癌细胞增殖及迁移能力的影响 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(8): 857-861.]
- [20] Rosenbluh J, Wang X, Hahn WC. Genomic insights into WNT/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(2): 103-109.

## 启 事

每期杂志出版后,本刊都将给作者/通讯作者通过邮局,以印刷品挂号形式寄赠当期杂志 2 册。如未能及时收到杂志,请登录 <http://www.chinaoncology.cn>

⇒ 点击肿瘤学杂志

再点击

信息公告

MORE

查找 2016 年第 X 期《肿瘤学杂志》

杂志作者邮寄名单,按“挂号”可在当地邮局查询。