论著

文章编号:1000-5404(2008)19-1832-04

Wnt5a基因在淋巴细胞系恶性肿瘤中的表达分析

邓 刚,司维柯,潘 静,赵 宸,李招权 (第三军医大学医学检验系临床血液学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 检测Wnt5a基因在淋巴细胞系恶性肿瘤患者骨髓中的表达,探讨Wnt5a基因与淋巴细胞系恶性肿瘤发生的关系。**方法** 采用氯化氨试剂裂解红细胞收集有核细胞;半定量RT-PCR方法检测19例淋巴细胞系恶性肿瘤、11例治疗缓解淋巴细胞系恶性肿瘤、27例正常人骨髓标本和10例脐带血$CD34^+$细胞中Wnt5a mRNA的表达;免疫细胞化学法检测部分标本中Wnt5a蛋白表达。**结果** Wnt5a mRNA在正常人、淋巴细胞系恶性肿瘤病例、治疗缓解病例和脐带血$CD34^+$细胞中的阳性表达率分别为88.9%(24/27)、10.5%(2/19)、72.7%(8/11)、100%(10/10),半定量均值分别为(0.401 5±0.150)、(0.113 9±0.048)、(0.357 0±0.141)、(0.247 5±0.095)。经统计学分析Wnt5a mRNA在淋巴细胞系恶性肿瘤病例中的表达明显低于正常人($P<0.05$);治疗缓解病例与正常人间没有显著性差异($P>0.05$),而与未缓解病例间有差异($P<0.05$);在脐带血$CD34^+$细胞中的表达低于正常人($P<0.05$)但高于淋巴细胞系恶性肿瘤病例($P<0.05$);Wnt5a蛋白在正常人中阳性表达,而在淋巴细胞系恶性肿瘤病例中低表达或表达缺失。**结论** Wnt5a基因在淋巴细胞系恶性肿瘤病例中表达缺失而在治疗缓解病例中表达恢复,提示淋巴细胞系恶性肿瘤的发生可能与Wnt5a基因表达缺失或下调有关,Wnt5a可以作为一个淋巴细胞系恶性肿瘤诊断与疗效评价的指标。

关键词: Wnt5a ; 淋巴细胞系恶性肿瘤;基因表达
中图法分类号: R394.2; R730.23; R733 **文献标识码:** A

Expressions of Wnt5a gene in lymphocytic malignant tumor

DENG Gang, SI Wei-ke, PAN Jing, ZHAO Chen, LI Zhao-quan (Department of Clinical Hematology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect the expressions of Wnt5a gene in bone marrow from lymphocytic malignant tumor patients and research the relationship between Wnt5a gene and lymphocytic malignant tumor. **Methods** Crack RBC and collect karyocyte with chloride ammonia reagent, and detect the expression of Wnt5a gene using semi-quantitative RT-PCR in 19 cases of lymphocytic malignant tumor, 11 cases of remission of lymphocytic malignant tumor, 27 healthy adults and 10 samples of umbilical cord blood $CD34^+$ cells. The expression of Wnt5a protein was analyzed by immunocytochemical staining in some samples. **Results** The positive rate of Wnt5a mRNA expression in healthy adults, the patients of lymphocytic malignant tumor, the patients in remission of lymphocytic malignant tumor and umbilical cord blood $CD34^+$ cells were 88.9% (24/27), 10.5% (2/19), 72.7% (8/11), 100% (10/10), respectively and their semi-quantitative RT-PCR results were respectively 0.401 5±0.150, 0.113 9±0.048, 0.357 0±0.141 and 0.247 5±0.095. The expression of Wnt5a mRNA was lower in lymphocytic malignant tumor patients and $CD34^+$ cells in umbilical cord blood than that in healthy adults ($P<0.05$), and that was higher in $CD34^+$ cells in umbilical cord blood than in lymphocytic malignant tumor patients, but no significant difference was found between the patients in remission of lymphocytic malignant tumor and healthy adults ($P>0.05$). Wnt5a protein expressed in healthy adults, the patients in remission of lymphocytic malignant tumor and $CD34^+$ cells from umbilical cord blood, but not in lymphocytic malignant tumor. **Conclusion** The expression of Wnt5a gene decreased during the development of lymphocytic malignant tumor and restored in the remission of lymphocytic malignant tumor. Our results indicate that lymphocytic malignant tumor may correlate with the decreasing or loss of Wnt5a mRNA expression. Wnt5a gene could be one of the indices for diagnosis and therapy of lymphocytic malignant tumor.

Key words: Wnt5a; lymphocytic malignant tumor; gene expression

作者简介: 邓 刚,男,重庆市万州区人,硕士研究生,技师,主要从事血液学方面的研究。电话:(023)68752311, E-mail: dghsd@21cn.com
通信作者: 司维柯,电话:(023)68752312,E-mail: weikesi2004@hotmail.com
收稿日期: 2008-04-01;**修回日期:** 2008-05-07

Wnt 蛋白是一类富含半胱氨酸的分泌性糖蛋白家族, Wnt5a 是其家族成员之一,与胚胎发育和肿瘤发生密切相关[1-3]。近来有研究显示在不同的肿瘤中, Wnt5a 基因表达失调不一致,在有的肿瘤中过表达,有的肿瘤中表达缺失。目前的研究尚无法解释 Wnt5a 基因在肿瘤中的作用,特别是在血液肿瘤中的研究报道较少。本研究观察了 Wnt5a 基因在淋巴细胞系恶性肿瘤和治疗缓解病例中 Wnt5a 基因的表达,并与正常人及脐带血 $CD34^+$ 细胞中 Wnt5a 基因的表达相比较,探讨 Wnt5a 基因表达与淋巴细胞系恶性肿瘤发生的关系,为进一步研究其在白血病发生、发展中的作用及其机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　标本来源　　我校西南医院血液科正常人骨髓标本 27 例,男性 14 例,女性 13 例,年龄 19 ~ 69 岁,平均 42 岁,西南医院、新桥医院血液科 2007 年 8 月至 2008 年 2 月收治的淋巴细胞系恶性肿瘤病例骨髓,共 30 例(B 淋巴细胞肿瘤 18 例,T 淋巴细胞肿瘤 12 例):男性 26 例,女性 14 例,年龄 8 ~ 72 岁,平均 38 岁;其中淋巴细胞系恶性肿瘤初诊病例 19 例(10 例急性淋巴细胞白血病 ALL, 3 例慢性淋巴细胞白血病 CLL,6 例非霍奇金淋巴瘤 NHL);淋巴系白血病缓解病例 11 例(7 例 ALL 缓解病例; 4 例 NHL 缓解病例),西南医院产科脐带血 10 例。全部病例诊断根据 MIC 分类标准确诊。

1.1.2　主要试剂和仪器　　氯化氨红细胞裂解液(139.6 mmol/L 氯化氨,16.96 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷),Trizol(Invitrogen 公司),RT-PCR 试剂盒(Toyobo 公司),PCR 仪(Bio-Rad 公司),紫外光凝胶成像分析仪(含 Quantity one 光密度测量软件,Bio-Rad 公司),用免疫磁珠试剂盒(direct CD34 progenitor cell isolation kit,MACS 公司), 一抗(兔抗人 Wnt 蛋白多克隆抗体,SATA CRUZ BIOTECHNOLOGY 公司),免疫组化染色试剂盒 SP-9001(中杉金桥公司)。

1.2　方法

1.2.1　白血病病例和健康人有核细胞的分离　　取 EDTA 抗凝的白血病病例和健康人骨髓 2 ~ 4 ml,加入 3 倍体积的氯化氨红细胞裂解液,颠倒混匀几次,室温放置 5 min,破坏红细胞, 10 000 r/min 离心 1 min,收集有核细胞。

1.2.2　用免疫磁珠试剂盒分离脐带血中 $CD34^+$ 细胞

1.2.3　总 RNA 的提取　　用 TRIZOL 提取细胞总 RNA,氯仿萃取分离,异丙醇沉淀 RNA,乙醇洗涤 RNA,干燥后用 DEPC 处理的水溶解 RNA,紫外分光光度法测定 RNA 吸光度值,计算其浓度,$D(260)/D(280)$ 鉴定其纯度,并作 RNA 变性凝胶电泳,检测提取物的完整性。

1.2.4　cDNA 的合成、PCR 产物的扩增及产物的鉴定　　逆转录反应体系 20 μl,包括无 RNA 酶的无菌纯水 10.5 μl, 109 μmol/L Oligo(DT)$_{20}$ 1 μl, 1 μl RNA (100 ng), 5 × BUFFER 4 μl, 10 mmol/L dNTP 2 μl, 40 U/μl RNAase 抑制剂 0.5 μl, 100 U/L 逆转录酶 1 μl,逆转录合成 cDNA 后,进行 PCR 扩增。应用 Primer Premier 软件设计 Wnt5a cDNA 、GAPDH cDNA 的引物,分别预实验确定循环数,使 Wnt5a cDNA 与 GAPDH cDNA 的 PCR 产物与循环数呈线性。Wnt5a cDNA 引物序列:5′-TGTGGTTTAATGGTGCCTGA-3′(正义),5′-TTCGTCGTGCTCAAGGTATG-3′(反义),扩增产物为 253 bp。反应条件: 总体积25 μl, 5 × 反应缓冲液,dNTP 10 mmol/L,cDNA 模板 1 μg。94 ℃预变性 5 min 后, 94 ℃变性 45 s,58 ℃退火 35 s,72 ℃延伸45 s,共 40 个循环,最后 72 ℃延伸 7 min。同时以看家基因 GAPDH 为内对照进行质控和标化,GAPDH cDNA 上游引物:5′-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG-3′,下游引物: 5′-TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3′产物大小为 443 bp , 反应条件:总体积 25 μl,5 × 反应缓冲液,dNTP 10 mmol/L,cDNA 模板 1 μg。Wnt5a cDNA 扩增条件为 94 ℃、5 min;94 ℃、45 s,58 ℃、40 s,72 ℃、45 s,循环 28 次;72 ℃、7 min。20 μl 扩增产物于 1.6% 琼脂凝胶电泳,扩增产物同样在含溴乙啶为 1.6% 琼脂糖凝胶上用 PCR 仪(Bio-Rad 公司)电泳分离,凝胶成像分析仪(Bio-Rad 公司)上用 Quantity one 软件检测 Wnt5a cDNA、GAPDH cDNA PCR 产物的 INT × mm^2 值,Wnt5a mRNA 表达的半定量值计算公式为: = INT × mm^2 (Wnt5a)/INT × mm^2 (GAPDH)。

1.2.5　免疫细胞化学检测　　采用 ABC 免疫细胞化学法。细胞涂片经多聚甲醛固定 30 min, 3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性, 10% 的正常羊血清封闭 15 min 后,置一抗(1∶100 稀释,阴性对照以 PBS 代替,)于湿盒中 37 ℃ 孵育 60 min ,再 4 ℃过夜, PBS 洗 5 次。滴加生物素标记二抗,37 ℃孵育 15 min,PBS 洗 5 次。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵蛋白,37 ℃孵育 15 min,PBS 洗 5 次,置 DAB 显色液中 5 ~ 10 min。苏木精复染细胞核,常规逐级乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封固。

1.3　统计学分析

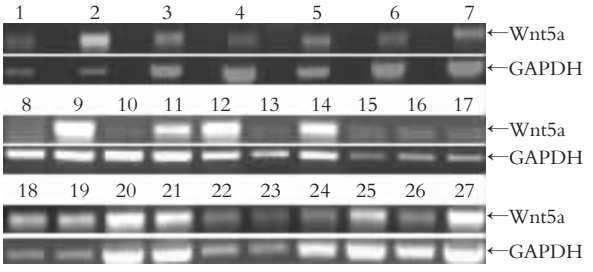
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间比较采用方差分析及两两比较,阳性表达率间比较采用 χ^2 检验及 χ^2 分割,统计软件为 SPSS 13.0。

2　结果

2.1　Wnt5a mRNA 在淋巴细胞系恶性肿瘤病例、脐带血 $CD34^+$ 细胞和正常人中转录水平的表达

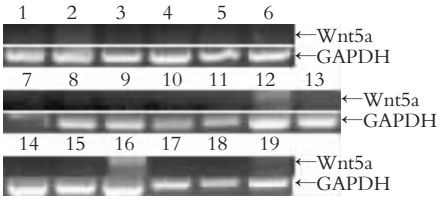
Wnt5a mRNA 阳性表达率:在淋巴细胞系恶性肿瘤病例为 10.5% (2/19)、治疗缓解病例为 72.7% (8/11)、脐带血 $CD34^+$ 细胞 100% (10/10)、正常人为 88.9% (24/27),经 χ^2 检验,差异有显著性意义($\chi^2 = 37.556$, $P = 0.000$)。且经 χ^2 分割,正常人与脐带血 $CD34^+$ 细胞的阳性表达率没有差异($\chi^2 = 0.178$, $P = 0.673$);正常人与淋巴细胞系恶性肿瘤病例的阳性表达率有差异($\chi^2 = 27.867$, $P = 0.000$);正常人与治疗缓解病例的阳性表达率没有差异($\chi^2 = 0.560$, $P = 0.454$);脐带血 $CD34^+$ 细胞与治疗缓解病例的阳性表达率没有差异($\chi^2 = 0.000$, $P = 1.000$);脐带血 $CD34^+$ 细胞与淋巴细胞系恶性肿瘤病例的阳性表达率有差异($\chi^2 = 21.623$, $P = 0.000$);治疗缓解病例与淋巴细胞系恶性肿瘤病例的阳性表达率有差异($\chi^2 = 9.492$, $P = 0.002$)。见图 1 ~ 4。

Wnt5a mRNA 半定量均值:在正常人为(0.401 5 ±0.150)、淋巴细胞系恶性肿瘤病例为(0.113 9 ±0.048)、治疗缓解病病例中为(0.357 0 ±0.091),脐带血 $CD34^+$ 细胞为(0.247 5 ±0.095),经方差分析,差异有显著性意义($F=22.733$, $P=0.000$)。且经两两比较,正常人与脐带血 $CD34^+$ 细胞的半定量值有差异($P=0.007$);正常人与淋巴细胞系恶性肿瘤病例的半定量值有差异($P=0.000$);正常人与治疗缓解病例的半定量值没有差异($P=0.942$);脐带血 $CD34^+$ 细胞与治疗缓解病例的半定量值没有差异($P=0.253$);脐带血 $CD34^+$ 细胞与淋巴细胞系恶性肿瘤病例的半定量值有差异($P=0.008$);治疗缓解病例与淋巴细胞系恶性肿瘤病例的半定量值有差异($P=0.001$)。见图1~4。



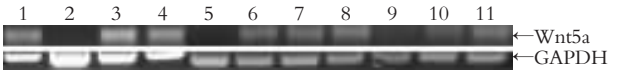
阳性率为:88.9%(24/27),Wnt5a mRNA 的半定量值均值为(0.401 5 ±0.150)

图1 RT-PCR 检测 27 例正常人骨髓 Wnt5a mRNA 阳性表达率及半定量电泳图谱



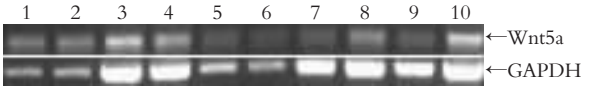
阳性率为:10.5%(2/19),Wnt5a mRNA 的半定量均值为(0.113 9 ±0.048)

图2 RT-PCR 检测 19 例淋巴细胞系恶性肿瘤病例 Wnt5a mRNA 表达半定量电泳图谱



阳性率为:72.7%(8/11);Wnt5a mRNA 的半定量均值为(0.357 0 ±0.091)

图3 RT-PCR 检测 11 例淋巴细胞系恶性肿瘤缓解病例 Wnt5a mRNA 表达半定量电泳图谱



阳性率为:100.0%(10/10),Wnt5a mRNA 的半定量均值为(0.247 5 ±0.141)

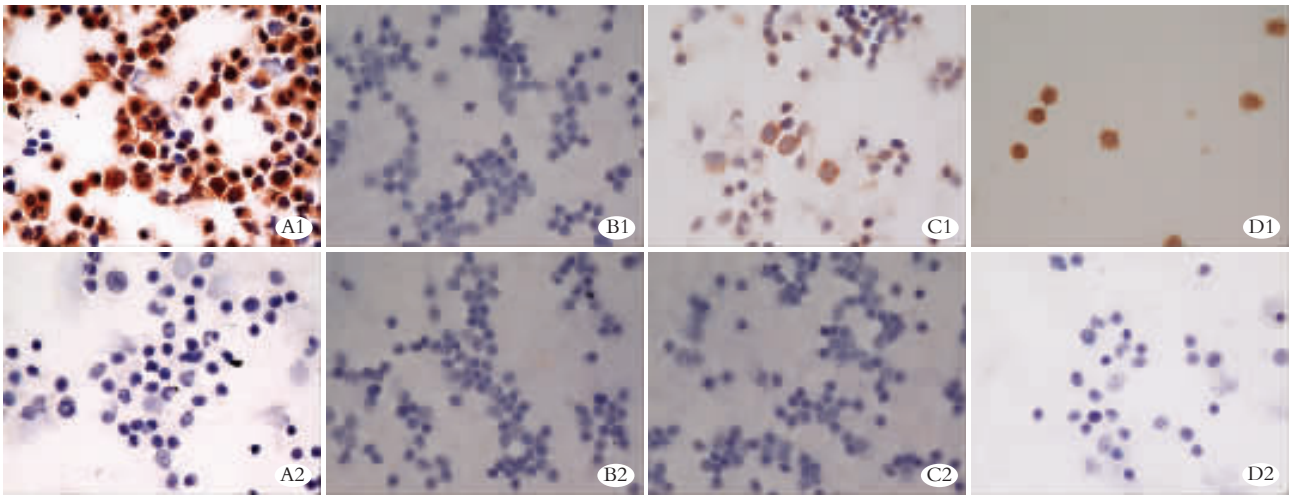
图4 RT-PCR 检测 10 例脐带血 $CD34^+$ 细胞 Wnt5a mRNA 表达半定量电泳图谱

2.2 Wnt5a 基因在淋巴细胞系恶性肿瘤病例、脐带血 $CD34^+$ 细胞和正常人中蛋白水平的表达

免疫细胞化学染色,胞核经苏木精复染,Wnt5a 蛋白在正常人、脐带血 $CD34^+$ 细胞和治疗缓解淋巴细胞系恶性肿瘤病例中均呈阳性,Wnt5a 蛋白主要分布于细胞质中呈棕黄色,而在淋巴细胞系恶性肿瘤病例中为阴性表达(图5)。

3 讨论

Wnt5a 基因定位于染色 3p14~p21,其转录蛋白具有生长因子的功能,与鼠的 Wnt5a 蛋白具有 >99% 的同源性。已发现多种肿瘤组织中 Wnt5a 基因表达上调,如原发性胃癌、脑胶质瘤、肺非小细胞癌、前列腺癌、头颈部鳞癌[4-6]。而在某些肿瘤中 Wnt5a 基因表达下调或缺失,如黑色素瘤、乳腺癌、甲状腺肿瘤、子宫内膜癌[7-9]等,现有资料显示,Wnt5a 基因在肿瘤发生中既有癌基因也有抑癌基因的活性。目前关于 Wnt5a 基因的表达与白血病的关系在国内外报道均较少,liang等[10]报道小鼠B细胞淋巴瘤中Wnt5a基因



A1:正常人;B1:淋巴细胞系恶性肿瘤;C1:治疗缓解;D1:$CD34^+$ 细胞;A2、B2、C2、D2:对应的阴性对照

图5 Wnt5a 蛋白在淋巴细胞系恶性肿瘤病例、脐带血 $CD34^+$ 细胞和正常人中的表达 (×400)

表达下调,并认为 Wnt5a 基因在血液肿瘤中具有抑癌基因的活性,本实验检测的人淋巴细胞系恶性肿瘤病例,包含了 B 淋巴细胞肿瘤和 T 淋巴细胞肿瘤,淋巴细胞白血病和淋巴瘤,同时还检测了治疗缓解的人淋巴细胞系恶性肿瘤病例。我们应用氯化铵试剂处理骨髓,获得有核细胞,检测分析 Wnt5a 基因在淋巴细胞系恶性肿瘤病例、正常人和脐带血 $CD34^+$ 细胞中的表达,结果显示,Wnt5a mRNA 在正常人和脐带血 $CD34^+$ 细胞均表达阳性,且二者的阳性率无差异,但正常人 Wnt5a mRNA 的半定量值高于 $CD34^+$ 细胞,而与治疗缓解的淋巴细胞系恶性肿瘤病例无显著性差异;在淋巴细胞系恶性肿瘤病例中表达阳性率和半定量值均明显低于正常人,表明淋巴细胞系恶性肿瘤中 Wnt5a mRNA 表达下调或缺失;在治疗缓解后的淋巴细胞系恶性肿瘤病例,其表达阳性率和半定量值均高于淋巴细胞系恶性肿瘤病例,但与正常人间无显著性差异,说明经治疗缓解后 Wnt5a mRNA 表达恢复并且逐渐接近正常水平。提示 Wnt5a 基因有抑癌基因的功能,Wnt5a 基因表达缺失可能与淋巴细胞系恶性肿瘤发生有关,本实验室的前期研究发现 Wnt5a 基因在非恶性血液病(缺铁性贫血 IDA、特发性血小板减少性紫癜 ITP 等)病例中阳性表达[11],而在髓系白血病病例中表达缺失或降低[12],因此其表达缺失可能是造血获得恶性增殖能力的原因之一。本实验以正常人骨髓有核细胞和正常人 $CD34^+$ 细胞分别作为相对成熟和原始有核细胞的正常对照,其 Wnt5a mRNA 均表达阳性,而且 $CD34^+$ 细胞表达低于正常成熟的有核细胞,这可能与 $CD34^+$ 细胞维持自我更新有关[13],也与 Wnt5a 基因在造血调节中具有促进分化和抑制血细胞过度增殖的作用相吻合[10],用外源性的 Wnt5a 蛋白可抑制白血病细胞株 K562 细胞增殖并诱导其分化,也支持这一结论[14],证实了 Wnt5a 基因有促进分化和抑癌的作用。因此 Wnt5a 分子可以作为一个淋巴细胞系恶性肿瘤诊断标志物,也可成为治疗的分子靶点和疗效评价的指标。Ying 等[15]作了 Wnt5a 基因在鼻的淋巴瘤细胞株中表达下调的机制分析,认为 Wnt5a 基因表达下调与其启动子甲基化有关,Wnt5a 基因在淋巴细胞系恶性肿瘤与其他白血病中的表达下调是否也与其启动子甲基化有关还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development [J]. Ann Rev Cell Dev Biol, 1998, 14: 59 – 88.

[2] Miller J R. Wnt Signal Transduction[M]// . Alison M. The Cancer Handbook. London: Nature Publushing Croup, 2002: 195 – 208.

[3] Polakis P. Wnt signaling and cancer[J]. Genes Dev, 2000,14(15): 1837 – 1851.

[4] Saitoh T, Mine T, Katoh M. Frequent up-regulation of WNT5A mRNA in primary gastric cancer[J]. Int J Mol Med, 2002, 9(5): 515 – 519.

[5] Howng S L, Wu C H, Cheng T S, *et al*. Differential expression of Wnt genes, beta-catenin and E-cadherin in human brain tumors[J]. Cancer Lett, 2002, 183(1): 95 – 101.

[6] Huang C L, Liu D, Nakano J, *et al*. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(34): 8765 – 8773.

[7] Bachmann I M, Straume O, Puntervoll H E, *et al*. Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(24 Pt 1): 8606 – 8614.

[8] Jonsson M, Dejmek J, Bendahl P O, *et al*. Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas[J]. Cancer Res, 2002, 62(2): 409 – 416.

[9] Kremenevskaja N, von-Wasielewski R, Rao A S, *et al*. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma[J]. Oncogene, 2005, 24(13): 2144 – 2154.

[10] Liang H, Chen Q, Coles A H, *et al*. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue[J]. Cancer Cell, 2003, 4(5): 349 – 360.

[11] 李招全,司维柯,潘　静,等. Wnt5a 基因在血液病及白血病细胞株中的表达[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(5): 927 – 930.

[12] 袁　媛, 李招全, 司维柯, 等. Wnt5a 与髓细胞白血病发生关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(21): 2056 – 2059.

[13] Van-Den-Berg D J, Sharma A K, Bruno E, *et al*. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis[J]. Blood, 1998, 92(9): 3189 – 3202.

[14] 袁　媛,司维柯,李招全,等. 外源性 Wnt5a 诱导 K562 细胞分化表型的实验研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(5): 946 – 949.

[15] Ying J, Li H, Chen Y W, *et al*. Wnt5a is epigenetically silenced in hematologic malignancies and inhibits leukemia cell growth as a tumor suppressor[J]. Blood, 2007, 110(12): 4130 – 4132.

(编辑　邓强庭)