

网络出版时间: 2020-9-24 13:13 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200923.1151.017.html>

TCF7L2 与 WNT7b 相互作用促进胃癌细胞增殖与转移

杨留洋^{1,2}, 高倩^{2,3}, 程民^{1,2}, 徐婷娟^{1,2}, 胡世莲^{1,2}, 沈国栋^{1,2}

摘要 目的 探讨胃癌细胞中受 TCF7L2 表达调控的 WNT7b 及它们对胃癌细胞增殖与转移的影响。方法 qPCR 与 PCR 芯片技术检测临床标本与胃癌细胞株中 TCF7L2 与 WNT7b 等基因的表达情况; 使用 200 ng/ml 重组人 WNT7b 蛋白处理 SGC7901 与 N87 等胃癌细胞株, qPCR 与 Western blot 法检测 TCF7L2 的表达, 双荧光素酶报告基因检测系统检测 β -catenin/TCF 结合活性; 为分析 WNT7b 对 TCF7L2 mRNA 稳定性的影响采用 2 μ g/ml 放线菌素 D 处理 N87 细胞。采用 CCK-8 试剂盒检测胃癌细胞的增殖能力, 细胞划痕与 Transwell 实验分析胃癌细胞的迁移能力。结果 分析 SGC7901/TCF7L2、N87/shTCF7L2 及其对照细胞株的 PCR 芯片数据, 发现受 TCF7L2 表达影响最大的 WNT 配体是 WNT7b。通过 17 例胃癌标本检测发现胃癌组织 TCF7L2 与 WNT7b 的转录水平均高于配对的癌旁正常组织, 且二者表达呈正相关关系。使用 WNT7b 处理 N87 细胞 24 h 即可发现细胞 TCF7L2 转录水平升高 ($P < 0.001$), WNT7b 同时增强了 TCF7L2 的 mRNA 稳定性 ($P < 0.05$), TCF7L2 的蛋白水平以及 β -catenin/TCF 结合活性也随之增高 ($P < 0.05$)。通过细胞学实验显示 WNT7b 与 TCF7L2 能够增强胃癌细胞的增殖与迁移能力 ($P < 0.05$)。结论 胃癌组织中 TCF7L2 与 WNT7b 表达水平高于正常对照组织; WNT7b 与 TCF7L2 之间存在相互促进表达的作用, 共同发挥对胃癌细胞增殖与迁移能力的调控。

关键词 胃癌; 肿瘤转移; WNT 信号通路; TCF7L2; WNT7b

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)11-1729-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.017

胃癌是常见恶性肿瘤之一, 我国胃癌每年新发病例与死亡病例均接近全球的一半^[1]。由于缺乏特异的生物标志物及靶向治疗药物, 这给胃癌诊治

带来许多困难, 大多数患者治疗后生存期仍然较短^[2]。WNT/ β -catenin 通路是 WNT 信号中的经典通路, 在胚胎发育及成体干细胞更新中发挥关键作用, 其信号异常激活被认为与肿瘤发生有关^[3]。课题组前期研究发现 WNT/ β -catenin 通路中转录因子 7 类似物 2 (transcription factor 7-like 2, TCF7L2) 能促进胃癌细胞增殖及对化疗耐药^[4], 但其具体机制尚不清楚。该研究揭示了 TCF7L2 与配体 WNT7b 通过相互增强表达的正反馈方式促进胃癌细胞增殖与转移的作用机制, 为寻找用于胃癌诊疗的标志物分子及研发新药提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 病例资料 按照安徽医科大学附属省立医院医学伦理委员会批准方案 (编号: 2019-X(H)-001), 收集 2019 年 5~12 月在安徽医科大学附属省立医院行胃癌手术且病理诊断为胃腺癌的标本 17 例 (患者均签署了知情同意书)。

1.1.2 细胞株与试剂 人胃癌细胞株 NCI-N87 (以下简称 N87) 与 SGC7901 购自中国医学科学院肿瘤医院研究所。胎牛血清 (FBS) 购自美国 Clark 公司; RPMI1640 培养基购自美国 Corning 公司; RIPA 裂解液及 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司; 蛋白磷酸酶及蛋白酶抑制剂 (cocktail) 购自瑞士 Roche 公司; BCA 试剂盒与化学发光显影液购自美国 Thermo-fisher 公司; β -actin 兔抗人抗体、TCF7L2 兔抗人抗体及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 人重组 WNT7b 蛋白购自台湾 Abnova 公司; 放线菌素 D 购自美国 MCE 公司; RNA 抽提试剂盒购自德国 Analytik Jena 公司; 逆转录反应试剂盒及荧光定量 PCR (qPCR) 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; PCR 芯片购自美国 Qiagen 公司; LipoHigh 脂质体高效转染试剂、G418 (遗传霉素) 与 TRIzol 购于生工生物工程 (上海) 股份公司; TCF7L2 过表达质粒与 shTCF7L2 质粒由上海吉玛制药技术有限公司构建; TOP-flash 和 pRL-TK 质粒购自上海权阳生

2020-07-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81802391); 安徽省中央引导地方科技发展专项项目 (编号: 2019b12030026、2019b11030012)

作者单位: ¹安徽医科大学附属省立医院老年医学科, 合肥 230001

²肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室, 合肥 230001

³安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032

作者简介: 杨留洋, 男, 硕士研究生;

沈国栋, 男, 研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: gdshen@ustc.edu.cn

物科技公司; 双荧光素酶报告基因检测系统购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 N87、SGC7901 等人胃癌细胞株培养于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中饱和湿度条件下培养。

1.2.2 质粒转染 提前 24 h 在 6 孔培养板中移植 N87 或 SGC7901 细胞(约 4 × 10⁵ 个/孔), 待细胞生长约 60% 满度时即可用于转染。将 LipoHigh 转染试剂按照说明书配制为 0.25 ml 转染液, 另配 0.25 ml 含 0.5 μg pcDNA3.1-TCF7L2 或者 shTCF7L2 质粒的无血清培养基, 室温孵育 5 min, 将上述 2 种溶液混合后室温孵育 20 min, 逐滴加入 6 孔培养板, 于培养箱中孵育 6 h, 更换含有血清的完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 48 h, 分别得到瞬时转染的 SGC7901/TCF7L2 与 N87/shTCF7L2 细胞; 稳转细胞株则后续培养在含 0.5 mg/ml G418 的完全培养基中进行筛选、挑取单克隆后获得。

1.2.3 mRNA 稳定性检测 参考 Li et al^[5] 的方法, 在 6 孔板中培养 N87 细胞(4 × 10⁵ 个/孔), 待细胞贴壁, 分为对照组和 WNT7b 组(培养基中含量为 200 ng/ml) 分别处理 48 h 后, 加入放线菌素 D(培养基中含量为 2 μg/ml) 分别处理 2、4、6 h, 收取细胞后使用 qPCR 方法检测。

1.2.4 qPCR 检测 分别使用 TRIzol 法抽提组织样本 RNA, RNA 抽提试剂盒提取并纯化胃癌细胞株的 RNA, 测定样品 RNA 浓度和纯度后, 根据逆转录试剂盒说明书操作逆转录为 cDNA, 然后使用 qPCR 试剂盒进行检测, 参数如下: 94 °C、30 s 预变性; 94 °C、5 s, 60 °C、30 s(荧光采集), 共 40 个循环, 读取每个反应的 Ct 值, 2^{-ΔΔCt} 表示基因相对表达量。GAPDH 作为内参, 引物名称与序列见表 1。

表 1 qPCR 引物名称与序列

引物名称	序列
TCF7L2-Forward Primer	5'-TGGAGGGCTCTTTAAGGGG-3'
TCF7L2-Reverse Primer	5'-GATCCGTGTTGGGAGGTAGG-3'
WNT7b-Forward Primer	5'-CACCTTCCTGCGCATCAAAC-3'
WNT7b-Reverse Primer	5'-GTCCTCCTCGCAGTAGTTGG-3'
GAPDH-Forward Primer	5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTAT-3'
GAPDH-Reverse Primer	5'-CTTCATTGACCTCAACTACATGG-3'

1.2.5 Western blot 检测 提取各组 N87 细胞总蛋白, BCA 法测定各组蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液后于水浴锅中煮沸 8 min, 经 SDS-PAGE 电泳分离后湿转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶室温条件下

封闭 1 h。一抗以兔抗人 β-actin 为内参, 兔抗人 TCF7L2 为目的蛋白 4 °C 孵育过夜; 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG。滴加显影液后使用化学发光成像仪成像并运用 Chemi Analysis 分析软件对蛋白电泳条带灰度值进行定量分析。蛋白相对定量 = 目的蛋白灰度值/同标本内参灰度值, 将对照的蛋白相对定量设为 1。

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测 按照双荧光素酶报告基因检测系统说明书, 取转染有报告基因质粒的 N87 细胞, 加入 Dual-Glo 试剂孵育 10 min 以使细胞充分裂解, 然后使用 Glomax 多重荧光检测仪测量萤火虫荧光素酶活性; 然后加入 Stop&Glo 试剂孵育 10 min, 测量海肾荧光素酶活性。最后以海肾荧光素酶活性的测量值标准化萤火虫荧光素酶活性值。

1.2.7 细胞增殖实验 选取 80% 满度的 SGC7901 细胞消化培养在 96 孔板, 每孔加入 2 000 个细胞, 分为 WNT7b 组、对照组: WNT7b 组加入 200 ng/ml WNT7b, 对照组加入同体积 PBS, 每组至少设置 5 个复孔。然后置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中分别培养 24 ~ 72 h 后, 更换新鲜培养基, 每孔加入 10 μl CCK-8 工作液, 在培养箱中孵育 4 h, 在 450 nm 波长测定吸光度。对于 SGC7901/TCF7L2、N87/shTCF7L2 及其对照细胞增殖实验采用类似方法操作。

1.2.8 细胞划痕实验 将 N87 细胞、N87/shTCF7L2 细胞、SGC7901 细胞、SGC7901/TCF7L2 细胞分别培养在 6 孔板中, 待细胞贴壁生长至 80% 满度时, 用 100 μl 无菌移液枪头沿孔中间轻轻划开, 然后用 PBS 洗涤细胞 2 次以除去漂浮细胞。其中 N87 细胞分为对照组与 WNT7b 组, WNT7b 组加入 200 ng/ml WNT7b, 对照组加入 PBS。上述细胞分别于 0 与 20 h 后拍照, 观察划痕愈合情况并测量距离。

1.2.9 Transwell 实验 使用 SGC7901 细胞, 消化离心后用无血清培养基重悬计数, 分别将 100 μl 含 5 × 10³ 细胞悬液加入 Transwell 上室, 对照组下室加入 200 μl 完全培养基, WNT7b 组的下室则含有 200 ng/ml WNT7b。在 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 12 h 后取出小室, 用 4% 中性福尔马林固定, 棉签小心擦去上室细胞, 结晶紫染色, 双蒸水洗涤后用镊子取下小室底膜, 50% 甘油封片, 10 × 物镜明场观察并随机选取 10 个视野进行计数分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用 *t*

检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌细胞中 TCF7L2 调控 WNT7b 基因表达

通过分析过表达 TCF7L2 的 SGC7901/TCF7L2 与质粒载体对照细胞株以及敲低 TCF7L2 的 N87/shTCF7L2 与对照细胞株的 PCR 芯片数据,结果显示受 TCF7L2 调控基因表达最显著的 WNT 配体是 WNT7b(表 2)。然后通过 17 例临床胃癌标本检测胃癌组织 TCF7L2 与 WNT7b 的转录水平均高于配对的癌旁正常组织,二者表达呈正相关关系(图 1),结果提示 WNT7b 可能是 TCF7L2 调控的下游靶基因之一。

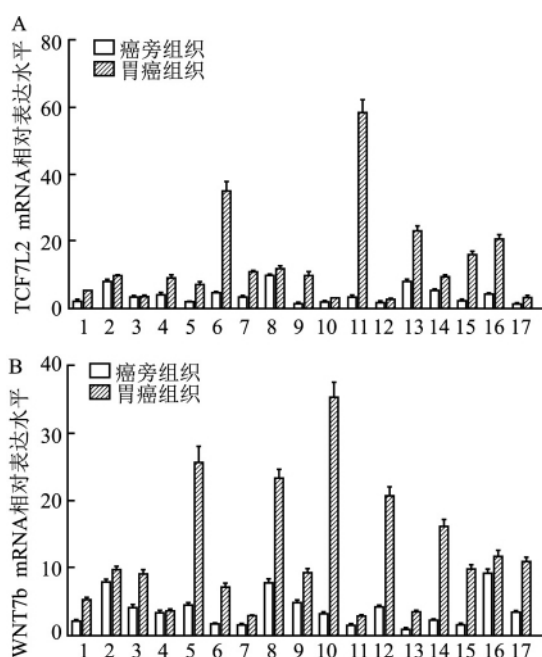


图 1 qPCR 检测胃癌组织 TCF7L2 和 WNT7b 的 mRNA 表达水平

A: 胃癌与癌旁组织 TCF7L2 的 mRNA 表达水平; B: 胃癌与癌旁组织 WNT7b 的 mRNA 表达水平; 1~17: 17 例配对的胃癌与癌旁对照组织标本

2.2 WNT7b 上调胃癌细胞 TCF7L2 表达与 WNT/ β -catenin 信号活性 使用 200 ng/ml 重组人 WNT7b 蛋白分别处理 N87 细胞 24、48、72、96 h,当 WNT7b 处理时间达到 24 h 后可见细胞中 TCF7L2 的 mRNA 表达量上升($t = -6.124$, $P = 0.004$),并且其表达量随着 WNT7b 刺激时间的延长而逐渐升高(48 h 组与 24 h 组之间比较, $t = -4.798$, $P = 0.001$)。为分析 WNT7b 对 TCF7L2 的 mRNA 半衰期的影响,使用 2 μ g/ml 放线菌素 D 处理 N87 细胞以抑制新的 mRNA 合成,处理 2 h 即可显示 WNT7b 组比对照组的 TCF7L2 mRNA 水平降低($t = 3.5$, P

表 2 TCF7L2 影响 WNT 配体表达水平

配体名称	TCF7L2/CON	shTCF7L2/CON
WNT1	0.200	7.800
WNT2	0.200	7.800
WNT2b	4.250	0.085
WNT3	6.750	0.030
WNT3a	0.092	16.800
WNT4	4.790	0.065
WNT5a	4.100	0.036
WNT5b	2.800	0.560
WNT6	30.000	0.046
WNT7a	11.400	0.078
WNT7b	96.900	0.020
WNT8a	0.200	0.078
WNT9a	36.900	0.098
WNT10a	31.700	0.052
WNT11	0.200	7.800

表中数字表示转录水平改变倍数

= 0.035); 并且随着放线菌素 D 处理时间的延长, WNT7b 组的 TCF7L2 的 mRNA 表达量衰减速率比对照组小些,提示 WNT7b 增强了 TCF7L2 的 mRNA 稳定性(图 2)。为分析 WNT7b 对 TCF7L2 蛋白表达的影响,使用 Western blot 法检测结果显示 WNT7b 处理的细胞 TCF7L2 蛋白表达水平上调,平均达到对照的 4.8 倍(图 3A)。进一步使用双荧光

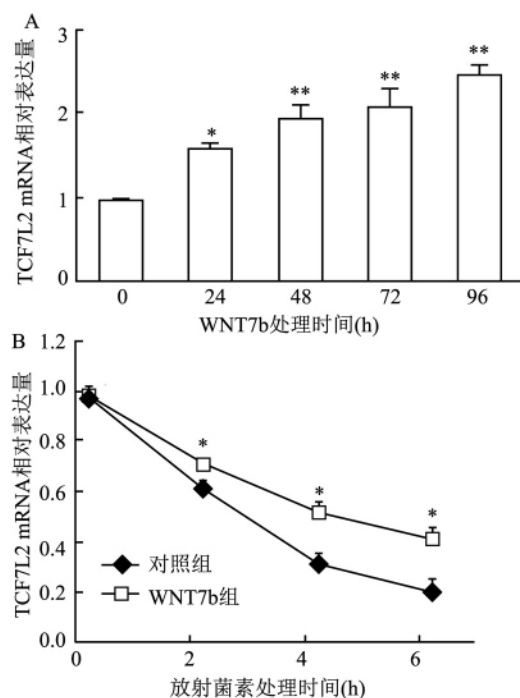


图 2 qPCR 法检测 N87 细胞中 TCF7L2 mRNA 水平

A: WNT7b (200 ng/ml) 处理 N87 细胞不同时间后 TCF7L2 的 mRNA 表达变化; 与 0 h 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; B: 放线菌素 D (2 μ g/ml) 处理 N87 细胞不同时间后 TCF7L2 的 mRNA 表达变化; 与对照组比较: * $P < 0.05$

素酶报告基因检测系统证实 WNT7b 能上调胃癌细胞 β -catenin/TCF 转录活性 ($t = -3.729$, $P = 0.027$ 40 mmol/L LiCl 处理作为阳性对照, 图 3)。这些结果提示 WNT7b 可能通过增强 TCF7L2 的 mRNA 稳定性而提高 TCF7L2 的蛋白表达水平, 从而上调胃癌细胞 WNT/ β -catenin 信号通路的活性。

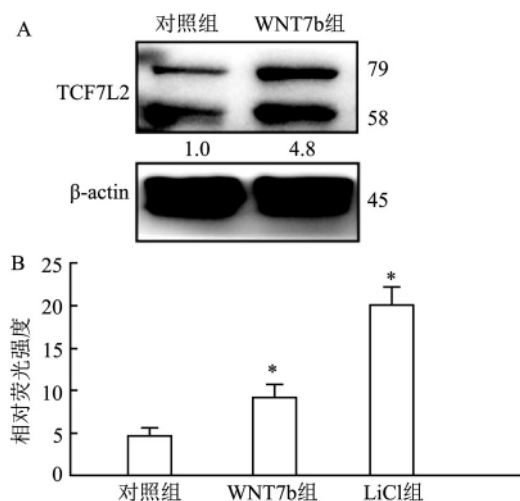


图3 WNT7b 组增强 N87 细胞中 TCF7L2 蛋白表达和 β -catenin/TCF 结合活性

A: Western blot 法检测 TCF7L2 蛋白表达; B: 双荧光素酶报告基因系统检测 β -catenin/TCF 结合活性; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 WNT7b 与 TCF7L2 促进胃癌细胞的增殖

为观察 WNT7b 对胃癌细胞增殖能力的影响, 使用 200 ng/ml WNT7b 重组蛋白处理 SGC7901 细胞 24 h 后检测, 显示 WNT7b 组细胞增殖能力增强 ($t = -5.583$, $P = 0.009$), 且随着培养时间延长到 72 h, 促进细胞增殖的效果相应增强 (图 4A)。然后, 比较过表达 TCF7L2 的 SGC7901/TCF7L2 细胞与对照细胞的增殖能力, 显示培养 48 h 后两组细胞数之间出现显著性差异 ($t = -19.701$, $P < 0.001$), 过表达

TCF7L2 组的细胞增殖明显加快 (图 4B); 反之, 敲低 TCF7L2 表达的 N87 细胞培养 24 h 后其增殖能力就出现下降 ($t = -7.662$, $P = 0.007$, 图 4C)。

2.4 WNT7b 与 TCF7L2 增强胃癌细胞的迁移能力

使用 200 ng/ml WNT7b 重组蛋白处理 SGC7901 细胞, 采用划痕实验, 结果显示 WNT7b 刺激 20 h 的 SGC7901 细胞迁移距离较长 ($t = -6.919$, $P = 0.009$, 图 5A); Transwell 实验结果显示 WNT7b 刺激 20 h 能够诱导 SGC7901 细胞迁移 ($t = -7.951$, $P < 0.001$, 图 5B)。类似的, 划痕实验检测显示过表达 TCF7L2 的 SGC7901/TCF7L2 细胞迁移能力增强 ($P < 0.001$), 而敲低 TCF7L2 表达的 N87/shTCF7L2 细胞的迁移能力减弱 ($t = -9.558$, $P < 0.001$, 图 5C)。

3 讨论

由于缺乏特异的生物标志物和靶向治疗药物, 胃癌患者的总体生存期较短^[6]。研究^[7]表明 WNT/ β -catenin 信号通路在胃肠道等多种肿瘤的发生和发展中发挥重要作用, 因此针对该通路研制药物可能是治疗肿瘤的一种有效措施。WNT/ β -catenin 信号通路需要依赖 β -catenin 入核与转录因子 TCF/LEF 结合形成转录复合物, 已知 TCF/LEF 家族包括 TCF1、LEF1、TCF3 与 TCF7L2 四个成员, TCF7L2 是其中功能较为复杂的一个成员。尽管已有一些报道提示 TCF7L2 在肠和胰腺等肿瘤中的作用, 但其在胃癌中的作用尚不清楚^[8]。另外, WNT 配体目前发现有 19 种, 已有报道多种 WNT 配体与胃癌有关: 如 WNT1 与胃癌的分期及预后有关^[9]; WNT2B 与胃癌淋巴结转移有关^[10]; WNT5A 在胃癌的进展期表达增多, 可以指征不良预后^[11]; WNT6 表达水平与胃癌恶性进展正相关, 与化疗响应负相关^[12] 以及

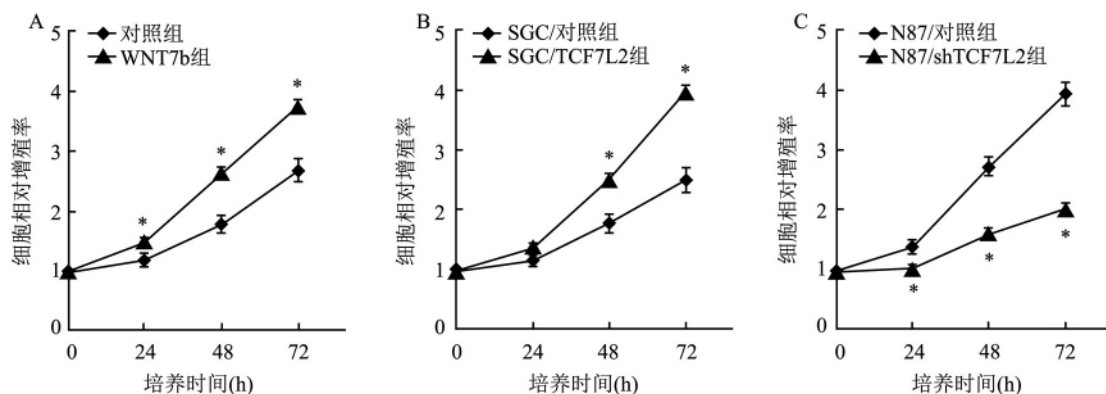


图4 WNT7b 与 TCF7L2 促进胃癌细胞增殖

A: CCK-8 实验检测 WNT7b 对 SGC7901 细胞增殖的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$; B: CCK-8 实验检测 TCF7L2 过表达对 SGC7901 细胞增殖的影响, 与 SGC/对照组比较: * $P < 0.05$; C: CCK-8 实验检测 TCF7L2 敲低表达对 N87 细胞增殖的影响, 与 N87/对照组比较: * $P < 0.05$

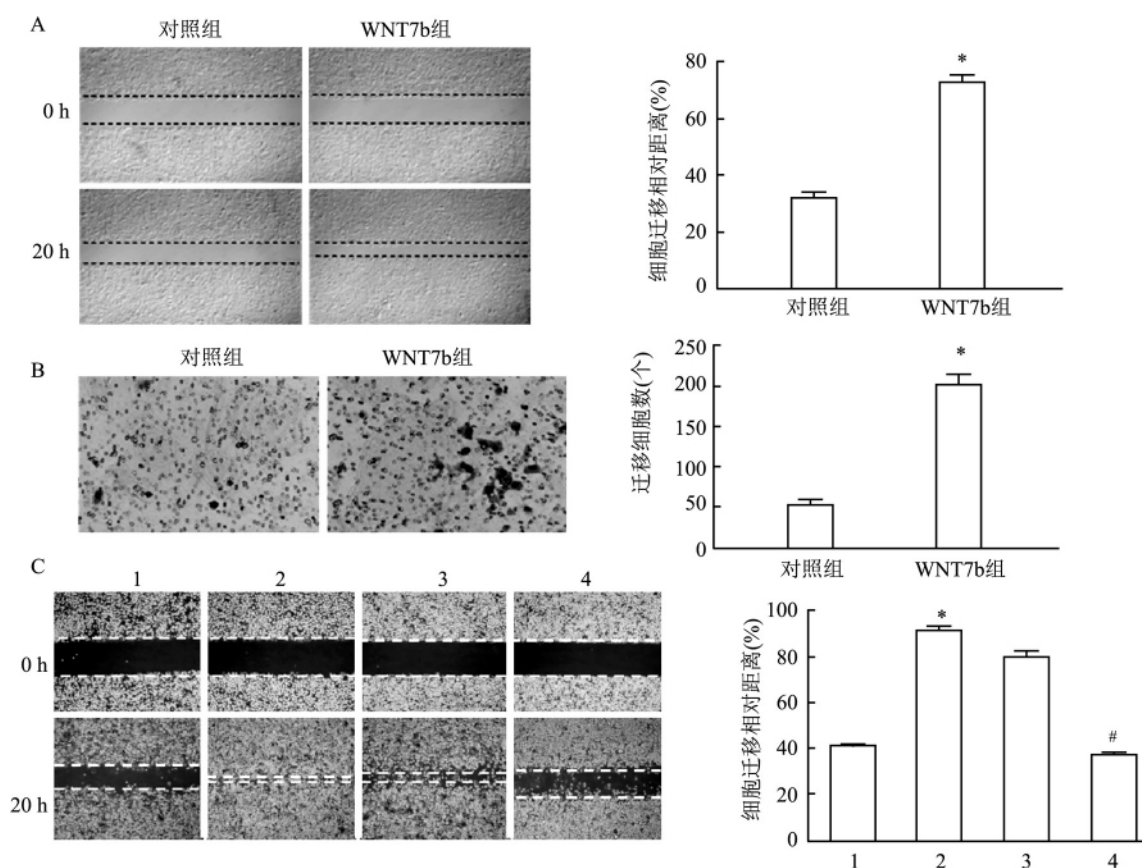


图5 WNT7b与TCF7L2增强胃癌细胞迁移能力

A: 划痕实验检测 200 ng/ml WNT7b 对 SGC7901 细胞迁移的影响 $\times 100$; 与对照组比较: * $P < 0.05$; B: Transwell 实验检测 200 ng/ml WNT7b 对 SGC7901 细胞迁移的影响 $\times 100$; 与对照组比较: * $P < 0.05$; C: 划痕实验分别检测 TCF7L2 过表达对 SGC7901 细胞及 TCF7L2 敲低表达对 N87 细胞迁移的影响 $\times 100$; 1: SGC/对照组; 2: SGC/TCF7L2 组; 3: N87/对照组; 4: N87/shTCF7L2 组; 与 SGC/对照组比较: * $P < 0.05$; 与 N87/对照组比较: # $P < 0.05$

WNT10B 高表达和胃癌的淋巴结转移相关^[13]等。WNT7b 作为 WNT 配体家族的重要成员,早期研究表明其参与胚胎发育过程中多种器官和组织的发生^[14]。近年的研究^[15]表明 WNT7B 在约有 10% 的乳腺癌中高表达,且表达越高预示患者预后越差,但尚未见到在胃癌中的研究报道。

本课题组前期研究显示 TCF7L2 分子在胃癌等肿瘤中存在过度表达^[4]。在此基础上,本研究通过对胃癌中受 TCF7L2 调控的 WNT 配体表达分析,显示 WNT7b 受影响最显著,而且在胃癌组织中 WNT7b 与 TCF7L2 的表达呈正相关关系,提示 WNT7b 可能是 TCF7L2 调控的下游靶基因之一。通过使用 WNT7b 重组活性蛋白刺激胃癌细胞显示 WNT7b 反过来能通过增强 TCF7L2 mRNA 的稳定性而上调 TCF7L2 的蛋白表达水平,进而提高了胃癌细胞 WNT/ β -catenin 信号通路活性。细胞增殖及 Transwell 和划痕实验检测结果显示 WNT7b 具有促进胃癌细胞增殖与迁移的作用。总之,这些结果表

明 WNT7b 与 TCF7L2 之间存在相互促进表达的作用,共同发挥对胃癌细胞增殖与迁移能力的调控。结果也提示 WNT7b 与 TCF7L2 有可能成为胃癌相关标记物分子与药物治疗靶点。但关于 WNT7b 与 TCF7L2 之间相互作用的具体机制及其临床应用价值还有待深入研究。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] Yonemura Y, Prabhu A, Sako S, et al. Long term survival after cytoreductive surgery combined with perioperative chemotherapy in gastric cancer patients with peritoneal metastasis[J]. Cancers (Basel) 2020, doi: org/10.3390/cancers12010116.
- [3] Mc Cracken K W, Aihara E, Martin B, et al. WNT/ β -catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans[J]. Nature 2017, 541(7636): 182-7.
- [4] 林明政, 沈国栋, 沈干, 等. T 细胞因子 4 在胃癌细胞增殖凋亡中的作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(8): 1092

- 6.
- [5] Li Q , Wang Y , Wu S , et al. CircACC1 regulates assembly and activation of AMPK complex under metabolic stress [J]. *Cell Metab* 2019 , 30(1) : 157 – 73.
- [6] Nie Y , Wu K , Yu J , et al. A global burden of gastric cancer: the major impact of China [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* , 2017 , 11(7) : 651 – 61.
- [7] Wenzel J , Rose K , Haghighi E B , et al. Loss of the nuclear Wnt pathway effector TCF7L2 promotes migration and invasion of human colorectal cancer cells [J]. *Oncogene* 2020 , 39(19) : 3893 – 909.
- [8] Xiang J , Hu Q , Qin Y , et al. TCF7L2 positively regulates aerobic glycolysis via the EGLN2/HIF-1 α axis and indicates prognosis in pancreatic cancer [J]. *Cell Death Dis* 2018 , 9: 321.
- [9] Jia S , Qu T , Feng M , et al. Association of Wnt1-inducible signaling pathway protein-1 with the proliferation , migration and invasion in gastric cancer cells [J]. *Tumour Biol* 2017 , 39(6) : 1 – 9.
- [10] Cheng X X , Wang Z C , Chen X Y , et al. Correlation of WNT-2 expression and beta-catenin intracellular accumulation in Chinese gastric cancers: relevance with tumour dissemination [J]. *Cancer Lett* , 2005 , 223(2) : 339 – 47.
- [11] Yamamoto H , Kitadai Y , Yamamoto H , et al. Laminin gamma2 mediates WNT5a-induced invasion of gastric cancer cells [J]. *Gastroenterology* , 2009 , 137(1) : 242 – 52.
- [12] Yuan G , Regel I , Lian F , et al. WNT6 is a novel target gene of caveolin-1 promoting chemoresistance to epirubicin in human gastric cancer cells [J]. *Oncogene* , 2013 , 32(3) : 375 – 87.
- [13] Wu X D , Bie Q L , Zhang B , et al. WNT10B is critical for the progression of gastric cancer [J]. *Oncology Letters* , 2017 , 13(6) : 4231 – 7.
- [14] Gavin B J , McMahon A P. Differential regulation of the WNT gene family during pregnancy and lactation suggests a role in postnatal development of the mammary gland [J]. *Mol Cell Biol* , 1992 , 12(5) : 2418 – 23.
- [15] Sundqvist A , Morikawa M , Ren J , et al. JUNB governs a feed-forward network of TGF β signaling that aggravates breast cancer invasion [J]. *Nucle Acids Res* , 2018 , 46(3) : 1180 – 95.

Study on the interaction of TCF7L2 and WNT7b to promote the metastasis of gastric cancer cells

Yang Liuyang^{1,2} , Gao Qian^{2,3} , Cheng Min^{1,2} , et al

(¹ Dept of Geriatrics , Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University , Hefei 230001;

² Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy , Hefei 230001;

³ School of Life Sciences Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the WNT ligands regulated by TCF7L2 in gastric cancer cells and their functions on the proliferation and metastasis of gastric cancer cells. **Methods** qPCR and PCR array methods were used to detect the expression of TCF7L2 and WNT7b genes in gastric cancer cell lines and clinical specimens. 200 ng/ml recombinant human WNT7b protein was used to treat gastric cancer cell lines SGC7901 and N87. qPCR , Western blot and dual-luciferase reporter gene detection system were used to detect TCF7L2 and β -catenin/TCF binding activity , respectively. 2 μ g/ml actinomycin D treatment was used to analyze the effect of WNT7b on TCF7L2 mRNA stability in N87 cells. CCK-8 kit , wound healing and transwell methods were used to analyze the abilities of proliferation and migration of gastric cancer cells. **Results** By analyzing PCR array data of SGC7901/TCF7L2 , N87/shTCF7L2 and their corresponding control cell lines , it was found that WNT7b was the most remarkable in the influenced WNT ligands by TCF7L2 expression. The detection of 17 gastric cancer specimens showed that the transcription levels of TCF7L2 and WNT7b in gastric cancer tissues were both higher than those in normal adjacent tissues , and there should be a positive correlation between the expressions of TCF7L2 and WNT7b. TCF7L2 transcription levels increased after the 24 h treatment of WNT7b protein on N87 cells ($P < 0.001$) . Meanwhile , TCF7L2 mRNA stability was enhanced ($P < 0.05$) , and TCF7L2 protein levels and the β -catenin/TCF binding activity were increased ($P < 0.05$) . Moreover , it was demonstrated that WNT7b and TCF7L2 enhanced the proliferation and migration abilities of gastric cancer cells ($P < 0.05$) through the cytology experiments. **Conclusion** The expression levels of TCF7L2 and WNT7b in gastric cancer tissues are higher than those in normal control. There is a mutual expression enhancement between WNT7b and TCF7L2 , which plays a role in regulating the proliferation and migration of gastric cancer cells together.

Key words gastric cancer; tumor metastasis; WNT signaling pathway; TCF7L2; WNT7b