

Wnt 信号通路相关蛋白在 TA2 小鼠自发性乳腺癌生成中的作用

李莉, 尹玉, 张诗武

摘要 目的 研究 Wnt 信号通路相关蛋白在 TA2 小鼠自发性乳腺癌生成中的作用。方法 收集 5 例正常 TA2 小鼠的乳腺组织、5 例自发性成瘤 TA2 小鼠的肿瘤组织及 5 例肿瘤对侧的乳腺癌前病变组织, 用免疫组织化学方法检测 TA2 小鼠正常乳腺组织、自发性成瘤 TA2 小鼠乳腺癌前病变组织及肿瘤组织中 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 蛋白的表达。结果

① 免疫组织化学检测结果显示: Wnt1、Wnt5a 在正常小鼠乳腺组织中为阴性表达, 在自发性成瘤小鼠乳腺癌前病变和乳腺癌组织胞质和细胞核中均有表达, 且在自发性成瘤小鼠乳腺癌前病变的表达强度高于在乳腺癌组织中的表达。 β -catenin 在正常小鼠乳腺组织主要在细胞膜上表达, 在自发性成瘤 TA2 小鼠乳腺癌前病变组织及肿瘤组织胞质中均有异常表达, 且在肿瘤组织的表达强度高于其在癌前病变组织中的表达。② Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 在正常乳腺组、自发性成瘤小鼠乳腺癌前病变组、肿瘤组中的阳性细胞表达率分别为 $(4.46 \pm 3.57)\%$ 、 $(96.50 \pm 6.30)\%$ 、 $(90.00 \pm 1.17)\%$ 、 $(2.27 \pm 4.55)\%$ 、 $(96.24 \pm 6.00)\%$ 、 $(95.90 \pm 4.32)\%$ 、 $(4.78 \pm 3.57)\%$ 、 $(60.59 \pm 5.63)\%$ 、 $(84.87 \pm 2.56)\%$, 三者在自发性成瘤小鼠乳腺癌前病变组、肿瘤组中的阳性细胞表达率与正常乳腺比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Wnt1、Wnt5a 在癌前病变组织中的阳性细胞表达率均高于肿瘤组织, Wnt1 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Wnt5a 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 β -catenin 在癌前病变组织中的阳性细胞表达率低于肿瘤组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 在 TA2 小鼠自发性乳腺癌生成过程中起促进作用。

关键词 Wnt1; Wnt5a; β -catenin; TA2 小鼠; 免疫组织化学; 自发性乳腺癌

中图分类号 R 730; R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)07-0887-04

无翅基因(wingless, wg)产物于 1973 年在果蝇中被发现, 与 1982 年由 Nusse et al^[1]发现的一种从鼠类乳腺癌病毒(mouse mammary tumor virus,)

MMTV) 诱导小鼠乳腺癌中克隆出的原癌基因(int-1 基因) 是同源基因, 两者合并称为 Wnt。经典的 Wnt 信号通路即 Wnt/ β -catenin 信号通路, β -catenin 是其关键信号传递子。文献^[2-5]报道 Wnt/ β -catenin 信号通路失活的结果会导致乳腺上皮细胞异常增生, 导致肿瘤的发生。该研究采用免疫组织化学方法检测 5 例 TA2 小鼠正常乳腺组织、5 例乳腺癌前病变组织和自发性乳腺癌组织中 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 表达, 探讨 Wnt 信号通路相关蛋白在 TA2 小鼠自发性乳腺癌生成中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与组织 收集自发性成瘤 TA2 雌鼠 5 只, 出生后 260 ~ 356 d, 怀孕次数为 1 ~ 3 次。体重 18 ~ 22 g, 本试验选择正常 TA2 雌鼠作为正常组。颈椎脱臼法处死小鼠, 取正常小鼠的乳腺组织、自发性成瘤小鼠的肿瘤组织及肿瘤对侧的乳腺癌前病变组织, 均经病理学检查证实。

1.1.2 主要试剂 兔抗鼠 Wnt1 及 Wnt5a 多克隆抗体(浓缩型, 工作浓度 1 : 100) 购自北京博奥森生物科技有限公司; 兔抗鼠 β -catenin 多克隆抗体(浓缩型, 工作浓度 1 : 600) 购自英国 Abcam 公司; PV-6000 免疫组化染色试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法 组织切片采用免疫组织化学方法 Envision 两步法, 严格按照说明书步骤操作, PBS 代替一抗作阴性对照, 用已知阳性组织切片作为阳性对照。结果判定标准, Wnt1、Wnt5a 定位于细胞质, 染色呈棕黄色, 阳性细胞百分数 $> 5\%$ 判断为阳性表达。正常乳腺组织中 β -catenin 定位于细胞膜, 染色呈棕黄色。根据 Maruyama et al^[6]的判断方法, 分别从细胞膜、细胞质、细胞核三方面判断 β -catenin 在细胞内的表达情况。若 $> 70\%$ 细胞膜着色, 则为正常表达, 反之则表达缺失; 若 $> 10\%$ 细胞的胞质或胞核着色, 则为胞质或胞核异位表达; 表达缺失或异位表达判断为异常表达。细胞阳性率计数方法是在 400 倍光学显微镜下观察切片, 共计数 5 个视野, 以阳性表达的肿瘤细胞数/总的肿瘤细胞数百分比来表示。

2014-02-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81071631、81201536)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院病理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 李莉, 女, 硕士研究生;

尹玉, 女, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: aydyinyu@aliyun.com;

张诗武, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhangshiwu666@aliyun.com

1.3 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件分析, 对正常小鼠乳腺、乳腺癌前病变、肿瘤组织中细胞阳性率结果进行 χ^2 检验统计分析。

2 结果

2.1 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 在正常乳腺、自发性成瘤小鼠的乳腺癌前病变组织及肿瘤组织中表达及分布情况 TA2 小鼠发瘤都位于皮下乳腺部位, 肿瘤呈圆形或椭圆形, 无明显包膜 和周围组织紧密粘连, 切开后质硬, 色灰红灰白, 可见空洞及出血坏死。HE 染色病理证实均为乳腺癌, 肿瘤对侧乳腺组织均为乳腺癌前病变。

免疫组化结果显示, Wnt1 及 Wnt5a 在正常小鼠乳腺组织中表达阴性, 在自发性成瘤 TA2 小鼠乳腺癌前病变及肿瘤组织中均呈阳性表达, 但癌前病变组织中的表达强度高于肿瘤组织。 β -catenin 在正常小鼠乳腺组织胞膜中表达, 在小鼠肿瘤组织胞质呈强阳性表达, 在癌前病变组织胞质中呈中等强度表达, 见图 1。

2.2 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 在 TA2 小鼠正常乳

腺组织、自发性成瘤小鼠乳腺癌前病变及肿瘤组织中阳性细胞表达率的比较 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 在自发性成瘤小鼠乳腺癌前病变及肿瘤组织中的阳性细胞表达率均显著高于正常乳腺组织, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。分别比较 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 在小鼠乳腺癌前病变及肿瘤组织中阳性细胞表达率, 结果显示: ① Wnt1 在癌前病变组织中的阳性细胞表达率高于肿瘤组织, 差异有统计学意义 ($P = 0.001$); ② Wnt5a 在癌前病变组织的阳性细胞表达率高于肿瘤组织, 差异无统计学意义 ($P = 0.239$); ③ β -catenin 在癌前病变组织中的阳性细胞表达率低于肿瘤组织, 差异有统计学意义 ($P = 0.005$)。见表 1。

表1 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 在 TA2 小鼠正常乳腺组织、自发性成瘤乳腺癌前病变及乳腺肿瘤组织中阳性细胞表达率的比较(%) ($\bar{x} \pm s$)

组别	Wnt1 阳性细胞 表达率	Wnt5a 阳性细胞 表达率	β -catenin 阳性 细胞表达率
正常乳腺	4.46 $\pm$ 3.57	2.27 $\pm$ 4.55	4.78 $\pm$ 3.57
癌前病变	96.50 $\pm$ 6.30 **	96.24 $\pm$ 6.00 **	60.59 $\pm$ 5.63 **
肿瘤	90.00 $\pm$ 1.17 **#	95.90 $\pm$ 4.32 **	84.87 $\pm$ 2.56 **#

与癌前病变组比较: # $P < 0.05$; 与正常乳腺组比较: ** $P < 0.01$

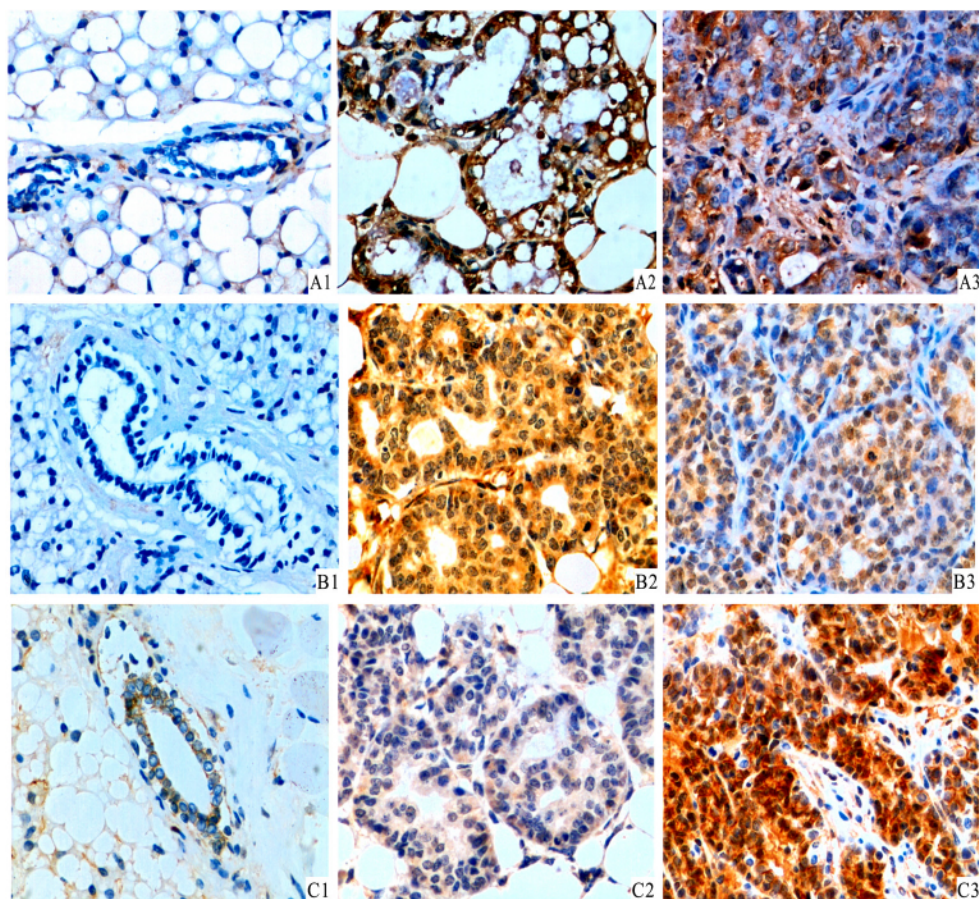


图1 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 在正常乳腺、自发性成瘤小鼠的乳腺癌前病变组织及肿瘤组织中表达及分布情况 Envision $\times 400$

A: Wnt1; B: Wnt5a; C: β -catenin; 1: 正常乳腺组织; 2: 乳腺癌前病变组织; 3: 乳腺肿瘤组织

3 讨论

在全世界范围内,乳腺癌是导致40~55岁妇女致死的主要原因,据统计每年被诊断为乳腺癌的妇女为14 000 000人,严重威胁着妇女的健康^[7]。Sørbye et al^[8]根据基因不同将乳腺癌分为5个亚型, luminal A、luminal B、normal breast-like、ERBB2 + (HER2 +) 及 Basal-like 乳腺癌。Basal-like 乳腺癌 ER、PR 及 HER2 均阴性,故称为三阴乳腺癌。据文献^[9]报道,TA2 自发性乳腺癌呈三阴表型,即 ER、PR、HER2 均阴性,与人类 Basal-like 乳腺癌相似。乳腺癌发病机制迄今为止仍不清楚,对其深入研究具有重要意义。TA2 小鼠是天津医科大学于20世纪50年代培育的近交系小鼠,源于昆明种小鼠,基因型稳定,在无任何外来化学药物等诱癌刺激下,具有很高的自发性乳腺癌发生率,因此是研究乳腺癌的良好动物模型^[10]。

Wnt 家族成员包括 Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7b、Wnt10b 等, Wnt1 是最早被发现的 Wnt 基因家族成员。刘芳等^[11]研究发现 Wnt1 在 TA2 小鼠乳腺癌前病变及乳腺癌组织的表达水平远远高于其在正常乳腺组织的表达水平,提示 Wnt1 在 TA2 小鼠自发性乳腺癌发生过程中起促进作用。本研究中 Wnt1 在正常小鼠乳腺组织中表达阴性,但在小鼠癌前病变及肿瘤组织细胞胞质中为阳性表达,且 Wnt1 在癌前病变及肿瘤组织中肿瘤细胞阳性表达率显著高于正常乳腺组,差异有统计学意义。另外,本研究结果显示 Wnt1 在小鼠乳腺肿瘤组织胞质中的表达强度低于其在癌前病变中的表达,具体机制有待于进一步研究。

作为 Wnt 家族另一重要成员, Wnt5a 基因定位于染色体 3P14.2 - P21.1 区。刘芳等^[11]采用基因芯片检测结果显示在 TA2 小鼠乳腺癌前病变及乳腺癌组织中, Wnt5a 表达水平高于正常乳腺组织。同时也有研究^[12]表明, Wnt5a 能促进恶性细胞活力及肿瘤的进展,在乳腺癌发展中起促进作用。本研究中免疫组化结果显示 Wnt5a 在 TA2 小鼠正常乳腺组织中表达阴性,但在自发性成瘤 TA2 小鼠乳腺肿瘤组织及乳腺癌前病变组织胞质中均为阳性表达,且小鼠乳腺癌前病变及乳腺肿瘤组织中细胞阳性率显著高于正常乳腺组,差异有统计学意义。

β -catenin 基因定位于染色体 3P22 - P21.3 上,全长 23.2 kbp,共有 16 个外显子,其分子量是 92 000 ku,是钙依赖性细胞所必需的一种胞质钙黏

蛋白相关的蛋白质。 β -catenin 在正常乳腺上皮细胞中主要分布于细胞膜,少量定位于细胞质,在维持上皮细胞间黏附及乳腺正常发育中发挥作用。本研究免疫组化结果显示, β -catenin 在 TA2 小鼠正常乳腺导管上皮细胞膜上表达,极少量在细胞质表达。研究^[13]表明,通过引起乳腺前体细胞及干细胞异常增生, Wnt/ β -catenin 信号通路可增加乳腺癌发病风险, β -catenin 信号可影响乳腺的整个发育过程,导致乳腺基底型细胞扩增,而乳腺基底型细胞可能是乳腺祖细胞的一个亚群,乳腺祖细胞可能使肿瘤的发病增加,同时,在乳腺腺管分泌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路的持续激活,会导致乳腺腺癌的发生。Wnt 经典通路中, Wnt 载体缺失情况下, β -catenin 与轴蛋白 (Axin)、结肠腺瘤性息肉病蛋白 (APC) 结合形成蛋白聚合体,通过与糖原合成酶结合, β -catenin 被磷酸化,后被 β -转导重复相容蛋白 (β -TrCP) 泛素化,最终降解。与 Wnt 通路配体结合,使 β -catenin 不被降解,在胞质中异常聚集并向细胞核转移,在细胞核中与 Lef/TCF 结合,启动目标靶基因 cyclinD₁、cmyc 等癌基因过表达,使细胞生长分化失调,导致肿瘤发生^[14]。本研究结果显示, β -catenin 在癌前病变组织及乳腺癌肿瘤组织中的表达定位于细胞质,且肿瘤组织及癌前病变组织的细胞阳性率显著高于正常乳腺组织,乳腺癌组织的阳性表达率高于癌前病变组织,证实了 β -catenin 在胞质中异常聚集,激活下游靶基因的转录,进一步导致 TA2 小鼠自发性乳腺癌生成。本研究结果未显示 β -catenin 在 TA2 小鼠肿瘤细胞核的表达,考虑原因可能是聚集在细胞核的 β -catenin 虽能激活下游靶基因,但表达量较少。

综上所述, Wnt/ β -catenin 信号通路在 TA2 小鼠自发性乳腺癌生成过程具有重要作用,其具体分子机制尚不完全清楚,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Nusse R, Varmus H E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome[J]. Cell, 1982, 31(1): 99 - 109.
- [2] Incassati A, Chandramouli A, Eelkema R, et al. Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: beta-catenin[J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(6): 213.
- [3] Liu B Y, McDermott S P, Khwaja S S, et al. The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(12): 4158 - 63.

- [4] Li Y, Welm B, Podsypanina K, et al. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(26): 15853–8.
- [5] Ayyanan A, Civenni G, Ciarloni L, et al. Increased Wnt signaling triggers oncogenic conversion of human breast epithelial cells by a Notch-dependent mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(10): 3799–804.
- [6] Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, et al. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer[J]. *Oncology*, 2000, 59(4): 302–9.
- [7] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [8] Sørli T, Perou C M, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(19): 10869–74.
- [9] 张丹芳, 孙保存, 赵秀兰, 等. 自发 Basal-like 乳腺癌小鼠模型研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(18): 1149–53.
- [10] Sun B, Zhang S, Zhang D, et al. Identification of metastasis-related proteins and their clinical relevance to triple-negative human breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 7050–9.
- [11] 刘芳, 孙保存, 张丹芳, 等. Wnt 家族成员在 TA2 小鼠乳腺癌生成过程中基因表达变化规律[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(7): 371–4.
- [12] Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, et al. Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(14): 5454–9.
- [13] Teulière J, Faraldo M M, Deugnier M A, et al. Targeted activation of β -catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia[J]. *Development*, 2005, 132(2): 267–77.
- [14] Incassati A, Chandramouli A, Eelkema R, et al. Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: beta-catenin[J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(6): 213.

The role of Wnt signal pathway related proteins in the development of spontaneous breast cancer in TA2 mice

Li Li, Yin Yu, Zhang Shiwu

(Dept of Pathology Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the role of Wnt signal pathway related proteins in the tumorigenesis of spontaneous breast cancer in TA2 mice. **Methods** Mammary glands were collected from tissues of normal 5 cases of TA2 mice. Spontaneous breast cancers and relevant mammary glands precancerous lesions were harvested from 5 cases of TA2 mice. Mammary tissue samples from normal TA2 mice, precancerous lesions and cancer tissues of spontaneous breast cancer-bearing TA2 mice were subsequently used to detect the expression of Wnt1, Wnt5a and β -catenin via immunohistochemical staining. **Results** ① Results of immunohistochemical staining showed that the positive expression of Wnt1 and Wnt5a located in cytoplasm in spontaneous breast cancers and mammary gland precancerous lesions from TA2 mice. The normal mammary glands were negative for Wnt1 and Wnt5a staining. The cytoplasm of precancerous lesions showed higher expression for Wnt1 and Wnt5a than them in the breast cancer. β -catenin in breast cancer and precancerous lesions were abnormal cytoplasmic expression. The expression level in breast cancer was higher than in the precancerous lesions. In normal mammary gland, the positive expression of β -catenin mainly located in the cytomembrane. ② The positive expression rates of Wnt1, Wnt5a and β -catenin in normal breast group, precancerous group and breast cancer group were (4.46 ± 3.57)%, (96.50 ± 6.30)%, (90.00 ± 1.17)%, (2.27 ± 4.55)%, (96.24 ± 6.00)%, (95.90 ± 4.32)%, (4.78 ± 3.57)%, (60.59 ± 5.63)%, (84.87 ± 2.56)% respectively. The positive expression rates of the three in precancerous group and breast cancer group were significantly higher than those in normal breast group ($P < 0.01$). The positive expression rates of Wnt1, Wnt5a in precancerous group were higher than those in the tumor group and the differences of Wnt1 had statistical significance ($P < 0.05$) while Wnt5a did not ($P > 0.05$). Compared with breast cancer group, the precancerous group had lower positive expression rate of β -catenin and the differences also had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Wnt1, Wnt5a and β -catenin promote the progression of spontaneous breast cancer in TA2 mice.

Key words Wnt1; Wnt5a; β -catenin; TA2 mice; immunohistochemistry; spontaneous breast cancer