

大鼠结肠癌形成过程中Wnt/PCP信号通路的作用

王建¹, 赵振春², 郭贞¹, 白明东¹

Role of Wnt/PCP Signal Pathway in Colon Carcinogenesis in Experimental Rats

WANG Jian¹, ZHAO Zhenchun², GUO Zhen¹, BAI Mingdong¹

1. Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, China; 2. Department of General Surgery, Remin Hospital of Xinyi City

Abstract: Objective To explore the role of Wnt/PCP signal pathways in colon carcinogenesis in experimental rats, for new targets in the treatment of colon cancer. **Methods** SD rats colon cancer model was established by MNU enema method. RT-PCR was applied to test the expression of Wnt7a, JNK and RhoA, which are important factors in Wnt/PCP signal pathway, in colon cancer tissue, colon atypical hyperplasia tissue and normal colon tissue. **Results** A total of 60 SD rats specimens were confirmed pathologically that atypical hyperplasia were formed in 28 rats and colon cancer were formed in 23 rats. RT-PCR showed that the expression of Wnt7a, JNK and RhoA mRNA in colon atypical hyperplasia tissue and colon cancer tissue were higher than that in normal colon tissue, with statistical difference. **Conclusion** Wnt/PCP signal pathway may play an important role in colon carcinogenesis.

Key words: Colon cancer; Wnt/PCP; Signal pathway

摘要: 目的 探讨Wnt/PCP信号通路在大鼠结肠癌形成过程中的作用, 为结肠癌靶向治疗寻找新的靶点。**方法** MNU(N-甲基-N-亚硝基脲)灌肠法诱导大鼠形成结肠肿瘤。RT-PCR技术检测Wnt/PCP信号通路中重要因子Wnt7a、JNK、RhoA在结肠癌组织、结肠非典型增生组织和正常结肠组织中的表达情况。**结果** 60只SD大鼠取标本后经病理证实, 有28只大鼠形成非典型增生, 23只形成结肠癌。Wnt7a、JNK和RhoA mRNA在结肠非典型增生组织及结肠癌组织中的表达高于正常结肠组织, 差异有统计学意义。**结论** Wnt/PCP信号通路在结肠癌发生发展过程中可能起重要作用。

关键词: 结肠癌; Wnt/PCP; 信号通路

中图分类号: R735.3⁺5; R73-35⁺4 **文献标识码:** A

0 引言

结肠肿瘤严重危害人类健康。因此, 对于结肠肿瘤发生、发展机制的探索, 一直是生命科学领域研究的焦点。目前这方面的研究主要集中在肿瘤相关基因的克隆和功能分析、细胞信号转导通路及细胞周期调控三大领域。近年来, Wnt信号通路不仅是发育生物学, 同时也是肿瘤生物学的研究热点。本实验就Wnt/PCP信号通路在大鼠结肠癌形成过程中的作用进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康4~6周龄雄性SD大鼠60只, 体质量150~180 g。

由徐州医学院实验动物中心提供。实验过程严格遵守国际伦理指南和我国涉及实验动物福利、管理和使用的条例和立法, 并通过徐州医学院实验动物伦理委员会审查。

1.2 主要试剂

N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)为美国Sigma公司产品; 总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、PCR试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司设计合成。

1.3 MNU灌肠诱导大鼠结肠肿瘤

先将MNU用二甲亚砜配成4 mg/ml溶液。灌药前禁食减少粪便干扰。灌肠前先让大鼠吸入适量乙醚, 减少大鼠躁动。将水润滑细导尿管剪成10 cm长, 与注射器相连, 经肛门插入结肠, 插入深度约为6~8 cm, 灌注剂量为20 mg/kg, 灌肠持续时间1 h后抽出灌肠液, 待大鼠清醒后恢复正常饮食和活动。开始时以3次/周连续灌注4周, 之后持续以1次/周灌注, 于灌药后12周和16周分两批处死大

收稿日期: 2013-08-21; 修回日期: 2014-04-18

基金项目: 徐州市医学科研课题资助项目(XWJ2011077)

作者单位: 1. 221006 江苏徐州, 徐州医学院第二附属医院普外科; 2. 新沂市人民医院普外科

作者简介: 王建(1966-), 男, 硕士, 主任医师, 主要从事结直肠癌的基础与临床研究

鼠,对于可疑结肠肿瘤,取部分组织以10%中性福尔马林固定备病理分析用,部分组织保存在-80℃冰箱中以备RT-PCR分析用,距可疑肿瘤组织至少5 cm外取正常结肠组织备用。

1.4 实验分组

将灌肠诱导所得23例结肠癌组织作为结肠癌组;将诱导所得28例结肠非典型增生组织随机剔除5例后作为非典型增生组;解剖过程中所取正常结肠组织随机抽取23例作为对照组。

1.5 RT-PCR检测Wnt7a、JNK和RhoA在各组织中的转录

用TRIzol提取液提取组织中的总RNA,按反转录试剂盒的操作步骤反转录成cDNA,再按照PCR试剂盒的操作步骤进行扩增,引物由上海生工设计合成,见表1。扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,紫外灯箱观察拍照后用ImageJ软件进行分析。

1.6 数据处理与统计学方法

半定量RT-PCR电泳条带灰度值用ImageJ软件分析获得。所有的计量资料均采用均数±标准($\bar{x} \pm s$)表示。组间数据比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。统计结果的图形由SPSS16.0统计软件绘制输出。

2 结果

2.1 大鼠结肠组织病理结果

于灌药12周和16周分批处死并收集可疑肿瘤组织,见图1A。分析各个实验组病理切片,肿瘤的变化呈现非典型增生-腺癌的变化过程。病理证实MNU灌肠法可以成功诱导SD大鼠结肠肿瘤的形

成,见图1B、1C。具体病理分型及数量见表2。

表2 MNU诱导结肠肿瘤病理分析结果

| Table2 Pathologic analysis of MNU-induced colon tumor | | | | |
|---|----|--------|----------------------|--------------|
| Time(week) | n | Normal | Atypical hyperplasia | Colon cancer |
| 12 | 30 | 6 | 20 | 4 |
| 16 | 30 | 3 | 8 | 19 |

Notes:MNU:N-methyl-N-nitroso urea

2.2 Wnt7a、JNK、RhoA在大鼠结肠组织中的表达
用半定量RT-PCR检测,Wnt/PCP信号通路中重要因子在结肠癌组织、结肠非典型增生组织和正常结肠组织中的表达情况,见图2。其数据统计见表3。

3 讨论

目前有多种结肠癌动物模型构建方法^[1],但是有些模型也存在部分缺陷,理想的动物模型应该是自然模拟结肠癌的发生发展过程。MNU经直肠灌注方式进入大鼠体内,其不依赖于体内酶代谢和肠道菌群转化,可直接作用于局部肠上皮,引起细胞癌变诱发结肠癌。与间接致癌物诱发的实验性结肠癌比较,MNU诱癌大肠癌具有方法简易、诱癌潜伏期短等特点^[2]。

本实验成功地通过MNU灌肠方法建立了SD大鼠结肠癌模型,成瘤时间相对较短,成瘤率高,肿瘤组织病理比较稳定,模拟了结肠癌自然发生的过程,应用SD大鼠提升了进一步实验操作的空间,为更深入地研究结肠癌发病机制、转移机制及治疗研究提供了一种理想的动物模型。

Wnt基因最初由Nusse和Varmus于1982年发现^[3],Wnt信号通路是由Wnt信号蛋白及其跨膜受体、胞质信号转导蛋白、调节因子、核内转录因

表1 RT-PCR引物序列、退火温度及产物大小

Table1 RT-PCR primers sequences, annealing temperature and product sizes

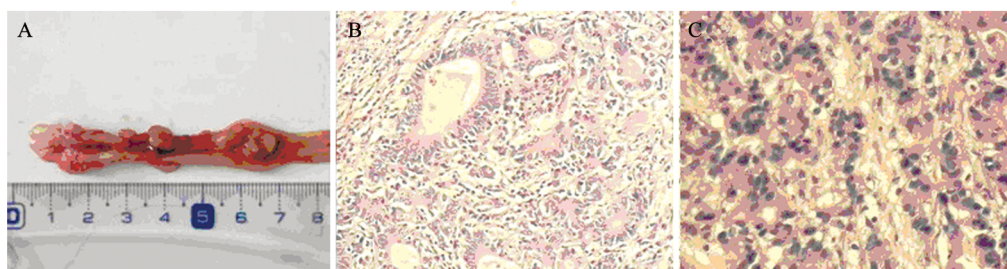
| Factors | Primer sequences | Annealing temperature (℃) | Product size (bps) |
|---------|--|---------------------------|--------------------|
| Wnt7a | F: 5'-CCTGGGCCACCTCTTTCTCAG-3' R: 5'-TCCAGCTTCATGTTCTCCTCCAG-3' | 58 | 573 |
| JNK | F: 5'-GGCCACACGAACCAAGAGGA-3' R: 5'-AGGAAGCGGTAGCCCAGGTA-3' | 56 | 455 |
| RhoA | F: 5'-GAGGAGACGTGCGAGAAACTCAA-3' R: 5'-ATCCTGACCACTGGAAGCCCTGT-3' | 55 | 346 |
| β-actin | F: 5'-CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC -3' R: 5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGA -3' | 60 | 218 |

表3 半定量RT-PCR电泳条带分析方法检测Wnt7a、JNK和RhoA在不同组织中的灰度值($\bar{x} \pm s$)

Table3 Semi-quantitative RT-PCR electrophoretic band analysis of grey value of Wnt7a, JNK and RhoA in different tissues($\bar{x} \pm s$)

| Factors | Normal colon tissue | Atypical hyperplasia tissue | Colon cancer tissue |
|---------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| β-actin | 654.670±88.672 | 718.895±141.654 | 767.892±101.565 |
| Wnt7a | 460.810±65.132 | 2859.212±363.369** | 3077.143±334.289** |
| JNK | 507.986±110.033 | 3587.817±318.006** | 3721.534±307.785** |
| RhoA | 535.287±88.322 | 2753.830±261.002* | 2926.517±241.284** |

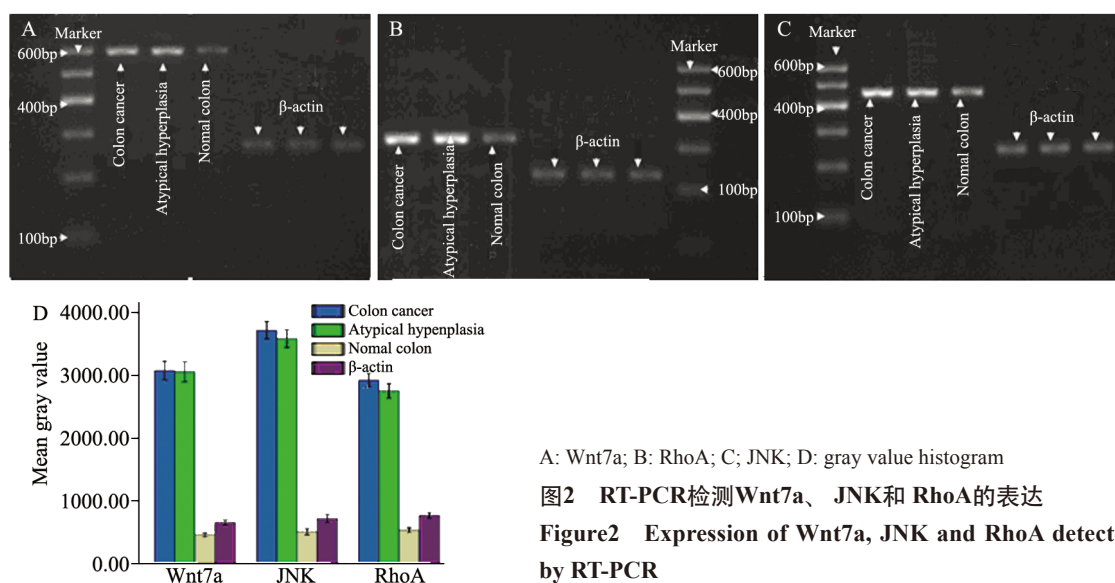
Notes: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, atypical hyperplasia tissue and colon cancer tissue compared with normal colon tissue



A: gross appearance; B: colon atypical hyperplasia tissue (HE ×100); C: colorectal tissue (HE ×200)

图1 MNU诱导所得大鼠结肠肿瘤组织

Figure 1 MNU-induced rats colon tumor tissues



A: Wnt7a; B: RhoA; C: JNK; D: gray value histogram

图2 RT-PCR检测Wnt7a、JNK和RhoA的表达

Figure 2 Expression of Wnt7a, JNK and RhoA detected by RT-PCR

子等共同组成的复杂信号转导通路。根据Wnt信号蛋白传递方式不同，Wnt信号通路分为三条途径：（1）经典Wnt信号途径：即Wnt/β-catenin信号途径。其在胚胎发育和肿瘤中的作用已基本阐明。因此，Wnt/β-catenin信号通路被公认为新的抗癌治疗的分子靶点^[4]；（2）Wnt/Ca²⁺途径：该通路调节细胞运动和黏着性，同时能拮抗经典Wnt信号通路，发挥抑癌作用^[5]；（3）平面细胞极性途径：在脊椎动物中又称Wnt/JNK途径，在胚胎发育阶段调控细胞骨架的重排，并参与原肠胚形成，但迄今为止尚无此途径涉及肿瘤事件的报道^[6-7]。随着研究的不断深入，Wnt通路在肿瘤中异常活化的机制主要涉及通路中各组成成员的异常表达，以及该通路拮抗物的失活。

我们的实验结果表明，在mRNA水平，Wnt7a、JNK和RhoA在结肠非典型增生组织及结肠癌组织中的表达均高于在正常结肠组织中的表达，经单因素方差分析，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ），而在结肠非典型增生组织和结肠癌组织中的表达却无明显差异。这表明Wnt/PCP信号通路在大鼠结肠癌形成过程中可能起到非常重要

的作用，可能成为肿瘤靶向治疗的靶点。

参考文献：

- [1] Zhou J, Cheng P, You JI, *et al.* Notch and wingless signaling cooperate in regulation of dendritic cell differentiation[J]. *Immunity*, 2009, 30(6): 845-59.
- [2] Tang WJ, Wu ZY, Yu DH. Experimental model for colorectal cancer[J]. *Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi*, 2000, 17(4): 380-1. [唐伟军, 吴志勇, 喻德洪. 结直肠癌的实验模型[J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(4): 380-1.]
- [3] Schwarz-Romond T. Three decades of Wnt signalling[J]. *EMBO J*, 2012, 31(12): 2664.
- [4] Takemaru KI, Ohmitsu M, Li FQ. An oncogenic hub: beta-catenin as a molecular target for cancer therapeutics[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008, (186): 261-84.
- [5] Ding SZ, Goldberg JB, Hatakeyama M. Helicobacter pylori infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis[J]. *Future Oncol*, 2010, 6(5): 851-62.
- [6] Velasco J, Zarrabeitia MT, Prieto JR, *et al.* Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis: differential expression and genetic association study[J]. *Osteoporos Int*, 2010, 21(1): 109-18.
- [7] Clément G, Guilleret I, He B, *et al.* Epigenetic alteration of the Wnt inhibitory factor-1 promoter occurs early in the carcinogenesis of Barrett's esophagus[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(1): 46-53.

[编辑：周永红；校对：杨卉]