

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.09.007

文章编号: 1005-8982 (2020) 09-0038-05

Wnt-1 诱导分泌蛋白 2 对胃癌细胞 上皮间质转化的影响 *

任春梅¹, 许斌², 邹文蓉³, 彭鹏³, 文黎明¹

(四川绵阳四〇四医院 1. 消化内科 2. 感染科 3. 血液肿瘤科 四川 绵阳 621000)

摘要: **目的** 探讨 Wnt-1 诱导分泌蛋白 2 (WISP2) 在胃癌组织中的表达及其对胃癌患者癌细胞上皮间质转化的影响。**方法** 选取 2016 年 3 月—2018 年 5 月四川绵阳四〇四医院收治的胃癌患者癌组织和癌旁组织标本, 每组 85 例。采用免疫组织化学法检测 WISP2 在胃癌组织和癌旁组织中的表达情况; 构建 WISP2-shRNA 和 NC-shRNA 稳定细胞系, 采用细胞划痕实验检测 WISP2 下调对胃癌细胞迁移的影响; 采用 Transwell 实验检测 WISP2 下调对胃癌细胞侵袭的影响; 采用 Western blotting 检测 WISP2 下调对胃癌细胞 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、神经-钙黏蛋白 (N-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 表达的影响。**结果** WISP2 在胃癌组织 (61.2%) 中的阳性表达率高于癌旁组织 (11.8%) ($P < 0.05$); 与 NC-shRNA 组 (84.74 ± 9.61) % 比较, WISP2-shRNA 组 (57.18 ± 6.05) % 细胞划痕愈合程度下降 ($P < 0.05$); WISP2-shRNA 组细胞侵袭个数 (195.36 ± 23.45) 较 NC-shRNA 组 (404.91 ± 38.16) 减少 ($P < 0.05$); 与 NC-shRNA 组比较, WISP2-shRNA 组细胞 E-Cadherin 的表达水平升高 ($P < 0.05$), N-Cadherin 和 Vimentin 的表达水平下降 ($P < 0.05$)。**结论** WISP2 在胃癌组织中高表达, 下调 WISP2 的表达可抑制胃癌细胞的上皮间质转化和侵袭转移。

关键词: 胃肿瘤; WISP2; 上皮间质转化; 迁移; 侵袭

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Effect of WISP2 on epithelial-mesenchymal transformation in gastric cancer cells*

Chun-mei Ren¹, Bin Xu², Wen-rong Zou³, Peng Peng³, Li-ming Wen¹

(1. Department of Gastroenterology, 2. Department of infection, 3. Department of Hematology and Oncology, Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Wnt-inducible secreted protein 2 (WISP2) in gastric cancer and its effect on epithelial-mesenchymal transition. **Methods** A total of 85 specimens of tumor tissues and adjacent tissues of gastric cancer patients from March 2016 to May 2018 were selected. The WISP2 expression in gastric cancer tissues and adjacent tissues was detected by immunohistochemistry. The WISP2-shRNA and NC-shRNA stable cell lines were constructed, and the effect of WISP2 down-regulation on migration of gastric cancer cells was analyzed by scratch wound healing assay. Transwell was used to detect the effect of WISP2 down-regulation on the invasion of gastric cancer cells. The effects of WISP2 down-regulation on the expression of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin in gastric cancer cells were detected by western blotting. **Results** The positive expression rate of WISP2 in gastric cancer tissues (61.2%) was significantly higher than that in adjacent tissues (11.8%) ($P < 0.05$). Compared with the NC-shRNA group (84.74 ± 9.61) %, the degree of cell healing in WISP2-

收稿日期: 2019-12-06

* 基金项目: 四川省卫生厅科学研究项目 (No: 16PJ376)

[通信作者] 许斌, E-mail: 623641947@qq.com

shRNA group was significantly decreased (57.18 ± 6.05) % ($P < 0.05$). The number of cell invasion in the WISP2-shRNA group (195.36 ± 23.45) was significantly lower than that in the NC-shRNA group (404.91 ± 38.16) ($P < 0.05$). Compared with NC-shRNA group, the expression of E-cadherin was significantly increased in WISP2-shRNA group, while the expression of N-Cadherin and Vimentin was significantly down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** WISP2 is highly expressed in gastric cancer tissues, and down-regulation of WISP2 expression can significantly inhibit EMT, invasion and metastasis of gastric cancer cells.

Keywords: stomach neoplasms; WISP2; epithelial-mesenchymal transition; migration; invasion

胃癌是消化道常见的恶性肿瘤之一^[1]。胃癌早期症状隐匿,确诊时多数患者已失去最佳的手术治疗机会。胃癌的侵袭、转移是造成患者死亡的首要原因^[2],了解胃癌的侵袭、转移机制对其临床诊疗具有重要的意义。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)是指上皮细胞向间质细胞转化的生物学过程,肿瘤细胞发生 EMT 后,细胞黏附性降低,具有更强的侵袭能力,是恶性肿瘤发生侵袭和转移的重要途径^[3]。Wnt-1 诱导分泌蛋白 2(Wnt-inducible secreted protein 2, WISP2)是 CNN 家族成员之一,广泛参与细胞增殖、分化、侵袭、间质转化、血管生成等多种生物学过程^[4]。近年来的研究发现 WISP2 在多种组织和肿瘤中存在差异性表达,并正向或负向调控肿瘤的发生、发展^[5]。本研究旨在探究 WISP2 对胃癌细胞 EMT 的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 3 月—2018 年 5 月四川绵阳四〇四医院接收并行胃癌根治术的胃癌患者 85 例,取其肿瘤组织和癌旁组织标本。其中,男性 51 例,女性 34 例;年龄 34 ~ 77 岁,平均(56.7 ± 5.7)岁;TNM 分期:Ⅰ期 14 例,Ⅱ期 29 例,Ⅲ期 27 例,Ⅳ期 15 例;分化程度:高分化 19 例,中分化 29 例,低分化 37 例;有淋巴结转移 50 例,无淋巴结转移 35 例。纳入标准:①所有患者肿瘤组织标本经病理学检测确定为原发性胃癌;②所有患者术前未接受放疗、化疗等抗肿瘤治疗;③所有患者临床病理资料完整;④排除合并其他恶性肿瘤、重大脏器疾病和免疫性疾病的患者。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者家属术前签署知情同意书。

1.2 免疫组织化学检测 WISP2 的表达及其判断标准

组织标本用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片。常规脱蜡、水化,柠檬酸钠抗原修复液高压加热 15 min, 3% 过氧化氢溶液室温孵育 10 min, 5% BAS 室温封闭

1 h。加入 1 : 50 稀释的兔多克隆 WISP2 抗体(英国 Abcam 公司),4℃孵育过夜。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,加入 1 : 5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(上海碧云天生物技术公司),室温孵育 1 h。PBS 冲洗 3 次,DAB 染色液(北京中杉金桥生物技术公司)显色,苏木精-伊红(HE)(北京中杉金桥生物技术公司)复染,脱水透明,中性树胶封片。光学显微镜观察。判断标准:免疫组织化学(以下简称免疫组化)结果由 2 位病理医师采用双盲法评估,每张切片随机选取 5 个视野,综合阳性细胞比例和染色强度判断。阳性细胞比例:阳性比例 <25% 为 1 分,25% ~ <50% 为 2 分,50% ~ 75% 为 3 分,>75% 为 4 分;染色强度:无着色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,黄褐色计 3 分。阳性细胞比例和染色强度乘积 0 ~ 2 分为阴性,≥ 3 分为阳性。

1.3 WISP2 敲低稳定细胞系构建

WISP2-shRNA-GFP 或 NC-shRNA-GFP 慢病毒表达载体(上海吉玛制药技术有限公司构建)分别与辅助质粒 pMD2.0G 和 pAXAS2 共转 293T 细胞,6 h 后更换培养基。48 h 后收集 WISP2-shRNA 和 NC-shRNA 病毒培养上清液,0.45 μm 滤器过滤,分别加入培养至对数生长期、密度为 70% 的人胃癌细胞 MGC80-3(武汉普诺赛生命科技公司)中,37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 感染 48 h 后,更换含 1 μg/ml 嘌呤霉素的新鲜培养基进行筛选,当显微镜下细胞均产生绿色荧光时表明细胞系构建成功。

1.4 细胞划痕实验检测 WISP2 敲低对细胞迁移能力的影响

WISP2-shRNA 和 NC-shRNA 慢病毒稳定细胞系培养至对数生长期,胰酶消化,重悬、计数并调整细胞密度至 2.5×10^5 个/ml,取 2 ml 接种于 6 孔板(6 孔板提前用 Marker 笔在板背均匀地划 5 条间隔横线),每组细胞设置 3 个复孔。37℃、5% CO₂ 培养过夜后,用 1 ml 枪头垂直于板背的横线划痕,PBS 洗 3 次以去除被划落的细胞,加入 2 ml 无血清培养基继续培养。

在第 0、6、12 及 24 小时用细胞成像设备扫描读板, 采用 Image J 分析划痕修复情况。

1.5 Transwell 检测 WISP2 敲低对细胞侵袭能力的影响

WISP2-shRNA 和 NC-shRNA 慢病毒稳定细胞系培养至对数生长期, 胰酶消化, PBS 洗 2 次, 无血清培养基重悬、计数并调整细胞密度至 5×10^5 个/ml, 取 100 μ l 接种于 Transwell 小室 (美国 Corning 公司) 中, 下室加入 500 μ l 完全培养基, 继续培养 24 h。Transwell 小室用 PBS 洗涤 2 次, 甲醇固定 30 min。PBS 洗涤 2 次后加入 0.1% 结晶紫 (北京索莱宝生物科技公司) 孵育 20 min。PBS 洗涤 2 次, 并用棉签轻轻擦拭上层未迁移的细胞, 显微镜下随机选取 5 个视野观察细胞侵袭情况。

1.6 Western blotting 检测 WISP2 敲低对 E-钙黏蛋白、神经-钙黏蛋白和波形蛋白表达的影响

WISP2-shRNA 和 NC-shRNA 慢病毒稳定细胞系培养至对数生长期, 胰酶消化并调整细胞密度至 2.5×10^5 个/ml, 取 2 ml 接种于 6 孔板, 过夜培养后, 弃上清, PBS 洗 1 次, 加入 RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司) 300 μ l, 冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 加入 SDS 上样缓冲液后煮沸 10 min。SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 5% BSA 封闭, 加入 1 : 50 稀释的 WISP2 抗体 (英国 Abcam 公司), 1 : 200 稀释的 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司), 1 : 500 稀释的神经-钙黏蛋白 (N-cadherin) 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司) 和 1 : 500 稀释的波形蛋白 (Vimentin) 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司), 4℃孵育过夜。PBST 洗 3 次, 加入 1 : 5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗 (上海碧云天生物技术有限公司), PBST 洗 3 次。电化学发光 (ECL) 液显影。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用 t 检验; 计数资料以率 (%) 表示, 比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 WISP2 在胃癌组织和癌旁组织中的表达

免疫组化结果显示, WISP2 主要定位于细胞质, 在癌旁组织和胃癌组织中的阳性表达率分别为 11.8% (10/85) 和 61.2% (52/85), 两者比较, 差异有统计学

意义 ($\chi^2=5.836$, $P=0.017$), WISP2 在胃癌组织中的阳性表达率高于癌旁组织。见图 1。

2.2 WISP2 敲低对胃癌细胞迁移的影响

细胞划痕实验结果显示, NC-shRNA 组和 WISP2-shRNA 组细胞愈合程度分别为 $(84.74 \pm 9.61)\%$ 和 $(57.18 \pm 6.05)\%$, 两者比较, 差异有统计学意义 ($t=3.091$, $P=0.023$), NC-shRNA 组细胞迁移能力高于 WISP2-shRNA 组细胞。见图 2。

2.3 WISP2 敲低对胃癌细胞侵袭的影响

Transwell 统计结果表明, NC-shRNA 组和 WISP2-shRNA 组细胞侵袭个数分别为 (404.91 ± 38.16) 和 (195.36 ± 23.45) 个, 两者比较, 差异有统计学意义 ($t=6.377$, $P=0.012$), WISP2-shRNA 组细胞侵袭个数较 NC-shRNA 组减少。见图 3。

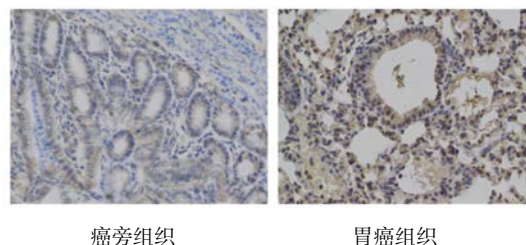


图 1 WISP2 在胃癌组织和癌旁组织中的表达 (免疫组织化学染色 $\times 200$)

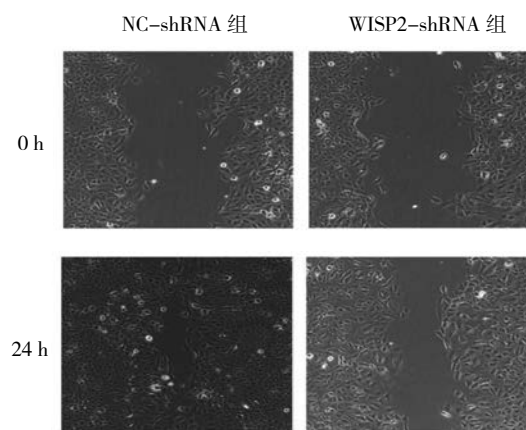


图 2 WISP2 敲低对胃癌细胞迁移能力的影响

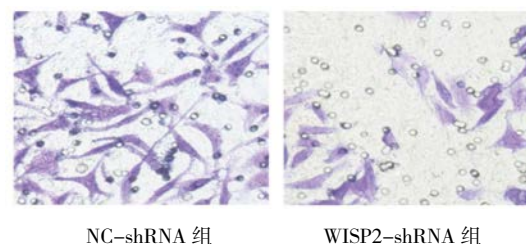


图 3 WISP2 敲低对胃癌细胞侵袭能力的影响 (0.1% 结晶紫 $\times 400$)

2.4 WISP2 敲低对胃癌细胞上皮间质转化相关蛋白表达的影响

两组 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 NC-shRNA 组比较, WISP2-shRNA 组细胞 E-cadherin 的相对表达量升高, N-cadherin 和 Vimentin 的相对表达量降低。见表 1 和图 4。

表 1 两组 WISP2、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	WISP2	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin
NC-shRNA 组	2.17 $\pm$ 0.24	0.37 $\pm$ 0.04	0.91 $\pm$ 0.07	1.66 $\pm$ 0.13
WISP2-shRNA 组	0.80 $\pm$ 0.06	1.13 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.05
<i>t</i> 值	7.045	7.970	5.612	6.643
<i>P</i> 值	0.008	0.003	0.018	0.010

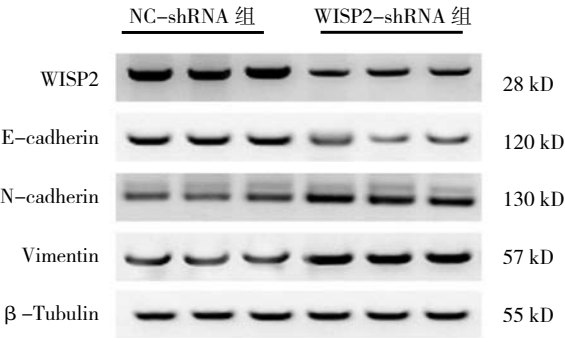


图 4 WISP2 敲低对上皮间质转化相关蛋白表达的影响

3 讨论

CNN 家族包括富半胱氨酸蛋白 61 (CRY61)、结缔组织生长因子 (CTGF)、肾母细胞瘤过表达蛋白 (NOV) 以及 Wnt 诱导的分泌蛋白 WISP-1、WISP2、WISP-3 6 种具有高度同源性和保守性的基质蛋白, 在胚胎发育、血管生成、创伤修复、炎症反应、纤维化以及肿瘤疾病等多种病理生理过程中发挥关键的作用^[6-7]。WISP2 又称 CNN5, 是一种长度为 250 个氨基酸、富含半胱氨酸的分泌性蛋白多肽, 在调节细胞增殖、黏附以及迁移过程中起着重要作用^[8]。WISP2 的异常表达与多种肿瘤的发生、发展密切相关。如 FRITAH 的研究^[9]显示, WISP2 是参与维持乳腺癌上皮细胞分化表型的重要调节因子, 并在肿瘤细胞的侵袭和转移中发挥关键作用; DAVIES 等^[10]证明 WISP2 在结直肠癌细胞表达水平低于正常组织, 且与正常组织比较, 高侵袭性肿瘤的表达水平更低; DHAR 的研究^[11]则显示 WISP2 在胰腺癌呈低表达, 并密切参与胰腺癌的

发生和进展。本研究发现, WISP2 在胃癌组织和癌旁组织中表达差异有统计学意义, 且在胃癌组织中的阳性表达率高于癌旁组织, 这与 LI 等^[12]的研究结果一致, 提示 WISP2 可能在胃癌的发生、发展中扮演重要角色。

WISP2 的表达对胃癌细胞生物学功能的影响。本研究结果显示, 与 NC-shRNA 组细胞比较, WISP2-shRNA 组细胞迁移能力下降, 细胞划痕愈合较慢; 此外, WISP2-shRNA 组细胞侵袭数较 NC-shRNA 组少。WISP2 下调可抑制胃癌细胞的迁移和侵袭, 在肿瘤的生长过程中起重要的调节作用。

肿瘤的发生、发展和侵袭转移是一个多基因、多水平、多步骤的复杂调控过程。研究显示, EMT 的发生与胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、食管癌等多种肿瘤的侵袭转移密切相关^[13-14]。EMT 发生后, 肿瘤细胞间的黏附力下降, 迁移和运动能力增强, 肿瘤细胞更易脱离原发灶进入体内循环系统, 进而导致远处转移的发生, 已被视为促进肿瘤发生、侵袭和转移的重要机制^[15]。EMT 的发生和调节涉及一系列的复杂信号传导通路, 最终体现在上皮细胞标志蛋白 E-cadherin、角蛋白的下降, 以及间质细胞标志蛋白 N-cadherin、Vimentin 和基质金属蛋白酶-9 的增加^[16]。E-cadherin 属钙黏蛋白家族成员, 主要介导细胞连接与黏附, 其表达缺失与多种上皮恶性肿瘤的侵袭和转移密切相关^[17]。N-cadherin 和 Vimentin 是间质细胞的重要标志蛋白, 其高表达与多种恶性肿瘤的增殖、浸润以及预后不良存在相关性^[18]。本研究发现, 与 NC-shRNA 组比较, WISP2-shRNA 组细胞 E-cadherin 的表达水平升高, N-cadherin 和 Vimentin 的表达水平下降, 提示 WISP2 的沉默可通过调控胃癌细胞的 EMT 进程, 进而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。

综上所述, WISP2 在胃癌组织中的高表达, WISP2 的下调可抑制胃癌细胞的 EMT 和转移过程, 但 WISP2 参与调控 EMT 的具体分子机制仍待后续的深入研究。

参 考 文 献:

[1] KARIMI P, ISLAMI F, ANANDASABAPATHY S, et al. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014, 23(5): 700-713.

[2] SANO T. Gastric cancer: Asia and the world[J]. Gastric Cancer, 2017, 20(Suppl 1): 1-2.

[3] MATĚJKA V M, FÍNEK J, KRÁLÍČKOVÁ M. Epithelial-mesenchymal transition in tumor tissue and its role for metastatic

- spread of cancer[J]. *Klin Onkol*, 2017, 30(1): 20-27.
- [4] GRÜNBERG J R, ELVIN J, PAUL A, et al. CCN5/WISP2 and metabolic diseases[J]. *J Cell Commun Signal*, 2018, 12(1): 309-318.
- [5] FREWER K A, SANDERS A J, OWEN S, et al. A role for WISP2 in colorectal cancer cell invasion and motility[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2013, 10(4): 187-196.
- [6] GRÜNBERG J R, HAMMARSTEDT A, HEDJAZIFAR S, et al. The novel secreted adipokine WNT1-inducible signaling pathway protein 2 (WISP2) is a mesenchymal cell activator of canonical WNT[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(10): 6899-6907.
- [7] OHKAWA Y, OHMI Y, TAJIMA O, et al. Wisp2/CCN5 up-regulated in the central nervous system of GM3-only mice facilitates neurite formation in Neuro2a cells via integrin Akt signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(3): 483-489.
- [8] CHOWDHURY S, WANG X, SRIKANT C B, et al. IGF-I stimulates CCN5/WISP2 gene expression in pancreatic β -cells, which promotes cell proliferation and survival against streptozotocin[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(5): 1629-1642.
- [9] FRITAH A, SAUCIER C, de WEVER O, et al. Role of WISP2/CCN5 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in human breast cancer cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(3): 1114-1123.
- [10] DAVIES S R, DAVIES M L, SANDERS A, et al. Differential expression of the CCN family member WISP-1, WISP2 and WISP-3 in human colorectal cancer and the prognostic implications[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(5): 1129-1136.
- [11] DHAR G, MEHTA S, BANERJEE S, et al. Loss of WISP2/CCN5 signaling in human pancreatic cancer: a potential mechanism for epithelial-mesenchymal-transition[J]. *Cancer Lett*, 2007, 254(1): 63-70.
- [12] LI L, CUI Y, JI J F, et al. Clinical correlation between WISP2 and β -Catenin in gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8): 4469-4473.
- [13] THIERY J P, ACLOQUE H, HUANG R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- [14] TERRY S, SAVAGNER P, ORTIZ-CUARAN S, et al. New insights into the role of EMT in tumor immune escape[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(7): 824-846.
- [15] ILLAM S P, NARAYANANKUTTY A, MATHEW S E, et al. Epithelial mesenchymal transition in cancer progression: preventive phytochemicals[J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2017, 12(3): 234-246.
- [16] RADISKY D C, LABARGE M A. Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(6): 511-512.
- [17] van ROY F, BERX G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(23): 3756-3788.
- [18] NAKAJIMA S, DOI R, TOYODA E, et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(12 Pt 1): 4125-4133.

(王荣兵 编辑)

本文引用格式: 任春梅, 许斌, 邹文蓉, 等. Wnt-1 诱导分泌蛋白 2 对胃癌细胞上皮间质转化的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(9): 38-42.