

## FZD3 基因和蛋白在大肠癌中的表达<sup>\*</sup>

何婉<sup>1</sup>, 成志强<sup>1</sup>, 黄思铨<sup>2</sup>, 许瑞莲<sup>1</sup>, 谭文勇<sup>1</sup>, 黄凯斌<sup>1</sup>, 钟克力<sup>1</sup>, 陈亦欣<sup>1</sup>, 陈明乐<sup>3</sup>, 傅宇翔<sup>1</sup>, 夏利刚<sup>1\*</sup>

(1. 暨南大学第二临床医学院, 深圳市人民医院, 广东 深圳 518020; 2. 香港理工大学, 香港; 3. 香港中文大学, 香港)

**[摘要]** 目的: 探讨 WNT 信号通路受体 FZD3 mRNA 及蛋白在大肠癌细胞及组织中的表达。方法: 取正常大肠细胞株 CCD18-Co、大肠癌细胞株 SW480 和 SW620, 以 WNT 信号通路 PCR 芯片筛选大肠癌细胞株中差异性表达的基因, 并选择 FZD3 基因采用 Taqman PCR 法进行验证其在大肠癌细胞中的高表达, 同时比较 FZD3 蛋白在大肠癌组织、腺瘤组织及癌旁正常组织的表达。结果: 与大肠正常细胞株 CCD18-Co 比较, 19 个基因在大肠癌细胞株 SW480 和 SW620 中表达上调, 其中 FZD3 基因为 CCD18-Co 的 195 倍和 105 倍; 验证结果显示, 与大肠正常细胞株 CCD18-Co FZD3 比较, FZD3 mRNA 在 SW480 和 SW620 细胞株中较中升高 820 倍和 622 倍, 验证了 FZD3 mRNA 在大肠癌细胞株中的高表达; 免疫组化结果显示, FZD3 蛋白在大肠癌组织中表达为 100%, 大肠腺瘤中的表达为 88%, 而癌旁正常组织中仅为 17.5%, 与癌旁正常组织相比, FZD3 蛋白在大肠癌组织中免疫组化分数高 6.6 倍 ( $P < 0.01$ ); FZD3 蛋白的高表达与肠癌 TNM 分期显著相关 ( $P < 0.005$ )。结论: FZD3 可能在大肠癌的发生、发展中起到潜在癌基因的作用。

**[关键词]** FZD3 基因; WNT 信号通路; 大肠; 肿瘤; PCR 芯片; 免疫组织化学; TNM 分期

**[中图分类号]** R735.34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)06-0681-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.06.014

## Expression of FZD3 Gene and Protein in Colorectal Cancer

HE Wan<sup>1</sup>, CHENG Zhiqiang<sup>1</sup>, HUANG Siquan<sup>2</sup>, XU Ruilian<sup>1</sup>, TAN Wenyong<sup>1</sup>, HUANG Kaibin<sup>1</sup>,  
ZHONG Keli<sup>1</sup>, CHEN Yixin<sup>1</sup>, CHAN Mingle<sup>3</sup>, FU Yuxiang<sup>1</sup>, XIA Ligang<sup>1</sup>

(1. The Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong, China;  
2. Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China; 3. The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore mRNA and protein expression of FZD3 receptor for WNT signaling pathway in colorectal cancer (CRC) cell lines and tissue and its clinical significance. **Methods:** Normal colorectal cell line CCD18-Co, colorectal cancer cell line SW480 and colorectal cancer cell line SW620 were selected in this study. The differentially expressed genes in colorectal cancer cell lines and normal colorectal cell line were screened by WNT signaling pathway PCR array, and FZD3 gene was chosen to validate the overexpression in CRC cell lines by using Taqman PCR assay. Meanwhile, FZD3 protein expression profile was also detected and compared between colorectal cancer tissue, adenoma tissue and adjacent normal tissue. **Results:** Compared with normal colorectal cell line CCD18-Co, nineteen genes up-regulated their expression in CRC cell lines SW480 and SW620, of which FZD3 gene expression was up-regulated by 195 and 105 folds in SW480 and SW620, respectively. Identification results showed compared with normal colorectal cell line CCD18-Co, FZD3 mRNA up-regulated its expression in SW480 and in SW620 by 820 folds and 622 folds, respectively. Immunohistochemical results showed that the expression of FZD3 protein in colorectal cancer tissue was 100%, the expression in colorectal adenoma was 88%, and the expression in the adjacent normal tissues was only

\* [基金项目] 深圳市卫生计生系统科研项目 (201401013)

\*\* 通信作者 E-mail: 393322301@qq.com

网络出版时间: 2016-06-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160616.1632.012.html>

17.5%。There was a 6.6-fold up-regulation of FZD3 protein expression in CRC tissue compared with in adjacent normal tissue ( $P < 0.01$ )。The high expression of FZD3 protein was significantly correlated with the TNM staging of colorectal cancer ( $P < 0.005$ )。 **Conclusion:** FZD3 may play a role in CRC tumorigenesis and development as a potential oncogene。

[ **Key words** ] FZD3 gene; WNT signaling pathway; colon; cancer; PCR array; immunohistochemistry; TNM staging

WNT 信号通路在大肠癌致瘤过程中通过 WNT 配体结合 Frizzled (FZD) 受体,引起核  $\beta$ -catenin 的转录活动,从而促进肿瘤细胞生长。以上称为 WNT 信号通路的经典通路<sup>[1]</sup>。WNT 信号通路还包括非经典通路及平面细胞极性通路<sup>[2]</sup>。人类 FZD3 基因编码 WNT 配体的受体,在 FZD 基因家族的 10 个成员中,FZD3 定位于 8 号染色体短臂 21 位点,高表达于中枢神经系统区域、睾丸、肾脏、子宫、前列腺和骨骼肌,而 RT-PCR 或 northern 杂交检测 FZD3 在其他正常人类组织低表达<sup>[3]</sup>。FZD3 被认为是多功能的蛋白,它既可在经典 WNT/ $\beta$ -catenin 途径又可在非经典的 WNT 途径甚至 PI3K-AKT 途径起作用<sup>[4]</sup>。相对于来自于人外周血中正常 B 细胞,定量 PCR 方法检测到 FZD3 mRNA 的表达在慢性淋巴细胞白血病细胞中升高<sup>[5]</sup>。乳腺癌中,FZD3 基因联合其他 5 种基因 (ITGB5, M-RIP, MMP16, RDX 和 RhoA) 是负向预后指标,以特异性 siRNA 敲减 FZD3 基因可降低乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的侵袭和迁移能力<sup>[6]</sup>。肝癌细胞中,FZD3,6,7 常常高表达,与活化的 FZD 依赖的包括经典  $\beta$ -catenin 途径和非经典 PKC 和 JNK 瀑布的信号通路相关<sup>[7]</sup>。更显著的是,大肠癌细胞株中 FZD3 mRNA 强烈表达,且在 46% 的家族性腺瘤性息肉 (FAP) 和 67% 散发性结肠腺瘤中检测到 FZD3 mRNA 的表达,表明 FZD3 在大肠癌的成瘤过程中起到关键的作用<sup>[8]</sup>。然而大肠癌中 FZD3 基因和蛋白的表达模式尚不清楚,且表达的意义值得进一步探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂** RPMI-1640、胎牛血清购于美国 Gibco 公司,Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司、Qiagen 试剂盒购自德国 Roche 公司;TaqMan 逆转录试剂、FZD3 特异性引物 (Hs00907279\_m1)、内参照 GAPDH 特异性引物 (Hs99999905\_m1) 和 TaqmanMGB 探针购自美国 Life technologies 公司,

人类 WNT signaling pathway RT2 Profiler™ PCR Array 及逆转录试剂盒 RT2 First Strand Kit (#C-03) 购于德国 QIAGEN 公司。

**1.1.2 细胞株** 人类大肠癌细胞株 SW480、SW620 和正常大肠细胞株 CCD18-Co 购买自美国 ATCC 公司 (<http://www.atcc.org/>),细胞常规培养于含 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI-1640 (#31800-022; Invitrogen Corporation, CA, USA) 完全培养液中,37 ℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养,稳定传代后至指数增长期用于实验。

**1.1.3 大肠癌组织** 从香港伊丽莎白医院病理科收集福尔马林固定、石蜡包埋的 40 例大肠癌组织及 41 例大肠腺瘤组织。大肠癌患者中男性 25 例 (62.5%),女性 15 例 (37.5%),中位年龄 59 岁。根据美国癌症联合会 (AJCC) 的标准: I 期 5 例 (12.5%) 为, II 期 13 例 (32.5%), III 期 14 例 (35.0%) 及 IV 期 8 例 (20.0%)。研究获得医院伦理委员会审核,患者签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 大肠癌细胞中人类 WNT 信号通路中高表达基因的筛选** 采用人类 WNT signaling pathway RT2 Profiler™ PCR Array 筛选,取 SW480、SW620 及 CCD18-Co 单层细胞,采用 Trizol 裂解细胞,提取总 RNA, NanoDrop 分光光度计测定总 RNA 的浓度及纯度;取 2  $\mu$ g 总 RNA,根据逆转录试剂盒 the RT2 First Strand Kit (#C-03) 说明书进行逆转得到 cDNA。25  $\mu$ L PCR Array 反应体系包括 cDNA、2  $\times$  SABiosciences RT2 qPCR 反应混合液和水,反应条件:95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 15 s、60 ℃ 退火/延伸 1 min,共 40 个循环,计算每孔达到阈值的循环数 (Ct)。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析结果,重复检测 3 次。按以下公式计算各转移相关基因 mRNA 相对表达量:  $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{对照组}} - \Delta Ct_{\text{试验组}}$ ,  $F = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。根据比较结果,选出 WNT 信号通路中高表达基因为 FZD3。

**1.2.2 验证大肠癌细胞中 FZD3 mRNA 表达** 采用实时定量 PCR 法,取 1.2.1 提取的总 RNA 2  $\mu$ g,

采用 TaqMan 逆转录试剂将 RNA 逆转录为 cDNA。20 μL PCR 反应系统包括 20 × TaqMan ⑧基因表达预混液 1 μL, TaqMan ⑧统一预混液 10 μL, 水 7 μL 及 cDNA 2 μL。50 ℃扩增 2 min, 95 ℃预变性 10 min, 95 ℃变性 15 s、60 ℃退火/延伸 1 min, 共 40 个循环。计算每个孔的达到阈值的循环数 (Ct)。按 1.2.1 项下方法进行结果分析。

1.2.3 大肠癌组织中 FZD3 蛋白表达 采用免疫组织化学法, 大肠癌组织石蜡切片在二甲苯中脱蜡, 分别经 100%、95% 和 70% 乙醇再水化, 最后在蒸馏水中洗涤。抗原修复及与 FZD3 抗体 (1:100 稀释) 结合的过程在 Ventana BenchMark XT 自动染色机上完成, 室温孵育约 1 h 32 min, 采用媒染二氨基联苯沉积物 DAB 检测蛋白表达; 玻片以苏木精复染, 经 70%、95% 及 100% 乙醇中脱水, 最后加载盖玻片。不加一抗作为阴性对照。由二位病理医师独立盲评结果并计分, 400 倍放大倍数取 5

个视野进行评估得分。IHC 评分 = 阳性细胞百分比 × 染色强度<sup>[9]</sup>。

1.3 统计学处理

计数资料数值用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较应用 *t* 检验。组间免疫组织化学评分比较采用 *Kruskal-Wallis* 检验, *Spearman rank* 相关检验用于分析 FZD3 蛋白表达相关的临床参数。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠癌细胞株中高表达基因的筛选

PCR 芯片结果显示, 与大肠正常细胞株 CCD18-Co 比较, 19 个基因在大肠癌细胞株 SW480 和 SW620 中表达上调, 其中 FZD3 基因的表达在 SW480 和 SW620 细胞中较在 CCD18-Co 中为 195 倍和 105 倍, 见表 1。

表 1 WNT 信号通路芯片中大肠癌细胞株 SW480 和 SW620 中的高表达基因  
Tab. 1 Nineteen up-regulated genes in both SW480 and SW620 cells compared with CCD18-Co cells in the WNT signaling pathway array

基因名称	编号	表达增高(倍)		相关通路	功能
		SW480	SW620		
AXIN1	Hs. 592082	3.34	4.63	WNT	经典 WNT 信号通路
CTNNB1	Hs. 23960	11.47	4.29	WNT	经典 WNT 信号通路
CTNNBIP1	Hs. 463759	2.35	4.23	WNT	经典 WNT 信号通路
PORCN	Hs. 386453	2.03	3.32	WNT	经典 WNT 信号通路
TCF7	Hs. 573153	42.52	2.46	WNT	经典 WNT 信号通路
DAAM1	Hs. 654934	3.84	2.81	WNT	平面细胞极性 WNT 信号通路
NKD1	Hs. 592059	1 408.55	3331.6	WNT	经典 WNT 信号通路
WNT11	Hs. 108219	639.15	280.53	WNT	WNT/Ca2+ 信号通路
WNT3	Hs. 445884	4.96	2.77	WNT	经典 WNT 信号通路
WNT6	Hs. 29764	5 712.87	793.45	WNT	经典 WNT 信号通路
WNT10A	Hs. 121540	3 169.41	485.05	WNT	经典 WNT 信号通路
FZD3	Hs. 40735	195.36	104.84	WNT	经典 WNT 信号通路
FZD5	Hs. 17631	9.99	12.57	WNT	经典 WNT 信号通路
MYC	Hs. 202453	8.28	8.65	WNT	WNT 信号靶基因
FOSL1	Hs. 283565	2.79	2.21	WNT	WNT 信号靶基因
PITX2	Hs. 643588	104.89	685.97	WNT	WNT 信号靶基因
T	Hs. 389457	109.90	86.34	WNT	WNT 信号靶基因
SLC9A3R1	Hs. 396783	28.44	18.62	WNT	细胞的自动调节
KREMEN1	Hs. 229335	2.81	13.47	WNT	WNT 信号负调节
HPRT1	Hs. 412707	4.23	5.00	WNT	管家基因

2.2 FZD3 mRNA 在大肠癌细胞中的高表达验证  
Taqman 探针 PCR 法验证 FZD3 mRNA 在大肠

癌细胞株中的表达。结果显示, 与大肠正常细胞株 CCD18-CoFZD3 比较, FZD3 mRNA 在 SW480 和

SW620 细胞株中较中升高 820 倍和 622 倍,验证了 Sybr Green PCR 芯片检测到的 FZD3 mRNA 在大肠癌细胞株中的高表达,见图 1。

### 2.3 FZD3 蛋白在大肠癌组织中的表达

免疫组化结果显示,FZD3 蛋白在大肠癌组织中表达为 100%,大肠腺瘤中的表达为 88%,而癌旁正常组织中仅为 17.5% (图 2)。与癌旁正常组织相比,FZD3 蛋白在大肠癌组织中免疫组化分数高 6.6 倍 ( $P < 0.01$ ),见图 3。FZD3 蛋白的高表达与肠癌 TNM 分期显著相关 ( $P < 0.005$ ),见图 4。

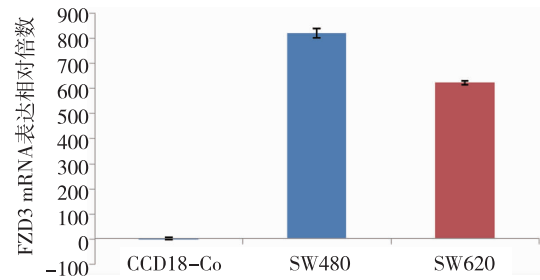
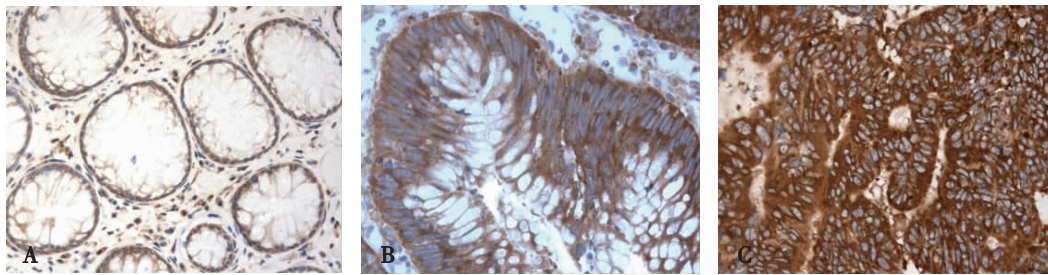


图 1 FZD3 mRNA 在大肠癌细胞株中高表达验证

Fig.1 Validation of FZD3 mRNA over-expression in CRC cell line



A 为癌旁正常组织,B 为大肠腺瘤组织,C 为大肠癌组织

图 2 FZD3 蛋白在大肠癌及大肠腺瘤组织中的表达

Fig.2 Expression of FZD3 protein in colorectal carcinoma and colorectal adenoma

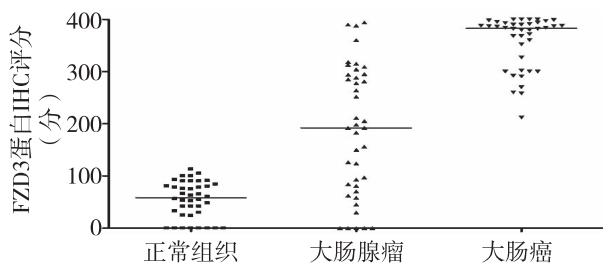


图 3 石蜡组织切片上 FZD3 染色的 IHC 评分

Fig.3 IHC score of FZD3 staining on paraffin sections

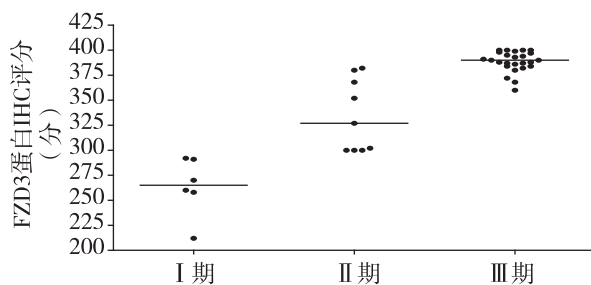


图 4 不同 TNM 分期大肠癌患者组织中 FZD3 蛋白表达 IHC 评分

Fig.4 IHC score of protein expression in the tissues of patients with colorectal cancer in different TNM staging

## 3 讨论

经典 WNT 信号通路的激活在大肠癌的发展中起主导作用。本研究结果显示包括 AXIN1, NKD1, PORCN, WNT10A, WNT3, WNT6, FZD3, FZD5, CTNNB1 ( $\beta$ -catenin), CTNNBIP1 和 TCF7 在内的 11 个经典 WNT 信号通路基因在 SW40 和 SW620 中表达增高,其中  $\beta$ -catenin 的表达是 WNT 信号通路生理性或异常激活的标志,同时 WNT 信号靶基因 MYC 在 2 种大肠癌细胞株中亦表达增高,至少部分因为经典 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路的过度激活导致<sup>[10]</sup>。除经典途径外,非经典 WNT 信号通路亦参与了大肠癌的发展<sup>[11]</sup>。例如 WNT3 和 WNT6 既参与经典途径又参与非经典途径,他们在 SW480 细胞中的高表达都曾报道<sup>[12]</sup>,本研究结果与之相符。大肠癌细胞株 SW620 和 SW480 来自同一病人的不同病情阶段,前者取自大肠癌 Duke's C 的病人 1 年后广泛转移至淋巴结的细胞。SW620 细胞中 WNT3 和 WNT6 仍然高表达可能提示 WNT 信号通路仍然异常激活。

FZD3 作为 WNT 信号通路的受体,在 Ewing 肉

瘤细胞中 WNT 诱导的神经元轴突生长中起主导作用<sup>[13]</sup>。FZD3 在分化差的食管鳞状细胞癌组织中高表达<sup>[14]</sup>。本研究采用 Taqman PCR 方法证实大肠癌细胞株 SW480 和 SW620 较正常肠细胞株 CCD18-Co 高表达 FZD3, 仔细比较侵袭性高的 SW620 细胞和侵袭性较低的 SW480, FZD3 的表达呈降低趋势, 这个现象曾在卵巢癌中报道, 即发生转移的卵巢癌中表达的 FZD3 mRNA 水平较局限的卵巢癌中低<sup>[15]</sup>。免疫组化的结果显示, FZD3 蛋白表达水平随着肿瘤的从腺瘤发展到大肠癌升高, 与此相反, Caldwell 等<sup>[16]</sup>发现 FZD3 mRNA 在 11/14 (79%) 大肠腺瘤中过表达, 但仅仅在 9/23 (39%) 大肠癌中过表达。另一项来自 Kyoto 基因及基因组百科全书 (KEGG) 数据库的数据也显示, 大肠癌相对于大肠腺瘤 FZD3 基因表达下降<sup>[16]</sup>。对于这种基因和蛋白表达的不一致性可能的解释是 mRNA 表达水平可能因为转录后、翻译或翻译后调节相关<sup>[17]</sup>。但真正原因还需进一步研究。课题组下一步还将探索同一大肠癌患者组织表达 FZD3 基因及蛋白的关系及潜在的机制, 以期阐明 FZD3 促进肿瘤进展可能的信号通路。

肿瘤组织 FZD3 IHC 分数高于 327 分的患者主要是 III 和 IV 期患者, 而分数  $\leq 327$  主要是 I 和 II 期患者<sup>[9]</sup>。结合本研究结果, FZD3 蛋白在患者大肠癌组织中随着临床 TNM 分期越晚表达越高, 提示 FZD3 可能作为一项大肠癌有用的预后工具。课题组也将进一步比较 FZD3 表达和传统大肠癌生物标志物 CEA 的表达的关系, 并试图探索 FZD3 蛋白在外周血的表达, 寻找新的辅助预后生物学标志。

总之, FZD3 基因在大肠癌细胞株中高表达, 蛋白水平亦在大肠腺瘤和大肠癌中表达升高, 并且具有一定的预后价值。

## 4 参考文献

- [1] MacDonald BT, Tamai K, He X. WNT/beta-catenin signaling: components, mechanisms and diseases[J]. Developmental Cell, 2009(1):9-26.
- [2] Habas R, Dawid IB. Dishevelled and WNT signalling: is the nucleus the final frontier[J]. Journal of Biology, 2005(1):2.
- [3] Kirikoshi H, Koike J, Sagara N, et al. Molecular cloning and genomic structure of Human Frizzled-3 at chromosome 8p21[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000(271):8-14.
- [4] Patel V. Balancing the WNTs in polycystic kidney disease[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2010(9):1412-1414.
- [5] Lu JB, Sun XB, Dai DX, et al. Epidemiology of gastroenterologic cancer in Henan province, China[J]. World Journal of Gastroenterology, 2003(9):2400-2403.
- [6] Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis[J]. Cell, 2009(6):1032-1046.
- [7] Bengochea A, de Souza MM, Lefran L, et al. Common dysregulation of WNT/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma[J]. British Journal of Cancer, 2008(99):143-150.
- [8] Caldwell GM, Jones CE, Ashley AM, et al. Wnt signalling in adenomas of familial adenomatous polyposis patients[J]. British Journal of Cancer, 2010(103):910-917.
- [9] Wong SCC, He WC, Chan CML, et al. Clinical Significance of frizzled homolog 3 protein in colorectal cancer patients[J]. PLoS One, 2013(11):e79481.
- [10] Li CM, Kim CE, Margolin AA, et al. CTNNB1 mutations and overexpression of WNT/beta-catenin target genes in WT1-mutant Wilms' tumours[J]. American Journal of Pathology, 2004(6):1943-1953.
- [11] Qi J, Zhu YQ. Targeting the most upstream site of WNT signaling pathway provides a strategic advantage for therapy in colorectal cancer[J]. Current Drug Targets, 2008(7):548-557.
- [12] Nishioka M, Ueno K, Hazama S, et al. Possible involvement of WNT11 in colorectal cancer progression[J]. Molecular Carcinogenesis, 2013(3):207-217.
- [13] Endo Y, Beauchamp E, Woods D, et al. Wnt-3a and Dickkopf-1 stimulate neurite outgrowth in Ewing tumor cells via a Frizzled3- and c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism[J]. Molecular and Cellular Biology, 2008(7):2368-2379.
- [14] Tapper J, Kettunen E, El-Rifai W, et al. Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma[J]. Cancer Genetics and Cytogenetics, 2001(1):1-6.
- [15] Caldwell GM, Jones CE, Soon Y, et al. Reorganization of Wnt-response pathways in colorectal tumorigenesis[J]. British Journal of Cancer, 2008(8):1437-1442.
- [16] Dalkic E, Nash DEW, Fassia MK, et al. Integrative analysis of cancer pathway progression and coherence[J]. Proteomics. Clinical Applications, 2009(4):473-485.
- [17] Chan CM, Ma BB, Wong CSC, et al. Cyclooxygenase-2 expression in advanced nasopharyngeal carcinoma—a prognostic evaluation and correlation with hypoxia inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor[J]. Oral Oncology, 2007(4):373-378.

(2016-03-15 收稿, 2016-05-29 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 刘华