

Twist1 在食管癌中的表达及其临床意义研究

刘善东¹, 黄云龙¹, 方炎鑫¹, 姚龙¹, 吴开明¹, 万军¹, 夏万里¹, 康宁宁¹, 姬强², 刘晓颖², 张仁泉¹

摘要 目的 研究 Twist1 在食管鳞状细胞癌中的表达情况, 探讨其在食管癌演变过程中的作用及临床意义。方法 用 Western blot 和免疫组织化学法检测正常食管组织、食管癌旁组织(距癌组织 2 cm 内组织)、食管鳞癌组织中 Twist1 的表达情况并阐明其与性别、年龄、肿瘤位置、细胞分化程度、临床分期、T 分期以及有无淋巴结转移等的关系。结果 Twist1 在食管鳞癌组织中阳性表达率(74.7%)明显高于癌旁组织(49.3%)和正常食管组织(38.4%), 差异有统计学意义($P=0.000$)。食管鳞状细胞癌中 Twist1 的阳性表达率在不同细胞分化程度、临床分期、T 分期组间差异有统计学意义($P<0.05$)。在不同性别、年龄、肿瘤部位、有无淋巴结转移组间差异无统计学意义。正常食管组织组、癌旁组织组、食管鳞癌组织组间 Twist1 的相对表达量差异有统计学意义($F=6.263$, $P=0.002$)。结论 Twist1 可能参与了食管鳞状细胞癌的发生、发展及恶性转化过程, 检测 Twist1 有助于食管鳞癌的诊断、判断其恶性程度。

关键词 Twist1 转录因子; 食管肿瘤; Western blot; 免疫组织化学

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1517-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.022

食管癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 2015 年我国新发食管癌病例 47.79 万例, 死亡人数为 37.50 万例^[1], 占全球一半以上, 我国食管癌仍以鳞状细胞癌为主。尽管目前在诊断、治疗等方面的研究取得了许多进展, 但总体的 5 年生存率仍然在 30% 左右, 远处转移和肿瘤复发是导致患者死亡的主要原因^[2], 因此从分子机制到临床的转化研究对食管癌防控意义重大。

Twist1 基因编码一个含基本碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH) 结构域和氨基酸基

序的转录因子, 属于 bHLH 蛋白家族^[3]。Twist1 可以调控肿瘤细胞上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT) 过程, 与细胞凋亡、多种恶性肿瘤(如乳腺上皮细胞肿瘤^[4]、胃癌^[5]、卵巢癌^[6]) 的形成、侵袭、转移^[7] 有密切关系。目前 Twist1 在食管癌中的表达在国内报道较少, 该研究应用免疫组织化学法和 Western blot 法检测食管鳞状细胞癌中 Twist1 的表达, 再探讨其表达与食管癌发生、发展、侵袭转移的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 2011 年 10 月~2014 年 5 月安徽医科大学第一附属医院胸外科食管癌手术切除的 221 例食管组织, 其中正常食管组织 73 例, 食管癌癌旁组织 67 例, 食管鳞癌组织 75 例。组织经 4% 多聚甲醛固定 24 h, 石蜡包埋 4 μm 厚连续切片, 供免疫组织化学检测。另取 162 例(包含 54 例正常的食管黏膜组织作为对照、54 例癌旁组织、54 例食管鳞癌组织) 新鲜的食管组织, 离体后 10 min 之内立即冻存于液氮中, 以备 Western blot 使用。所有标本为初治, 术前未实行任何治疗, 已经病理医师诊断证实。

1.2 实验方法

1.2.1 主要试剂 兔抗人 Twist1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司); 免疫组化一步法 Polink-1(PV-6000 法) 试剂盒、二氨基联苯胺(DAB) 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); 二喹啉甲酸蛋白浓度定量试剂盒(北京百泰克公司); 聚偏二氟乙烯(PVDF) 膜(美国 Invitrogen 公司); 电化学发光检测试剂盒、蛋白提取试剂盒(RIPA 裂解液)(上海碧云天生物技术研究所)。

1.2.2 免疫组化法 采用免疫组化一步法。石蜡切片, 二甲苯脱蜡 1 h, 梯度乙醇连续脱水, 用枸橼酸缓冲液高压加热抗原修复 15 min, 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 加兔抗人 Twist1 多克隆抗体(稀释 1:250), 湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜, 室温下复温 PBS 冲洗, 加山羊抗兔 IgG/HRP 聚合物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 30 min 后 PBS 冲洗, DAB 显色并适时终

2017-05-03 接收

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目(编号: KJ2016A358)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院普胸外科, 合肥 230022

²安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032

作者简介: 刘善东, 男, 硕士研究生, 医师;

张仁泉, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: zhangrenquan@live.cn

止 苏木精复染 ,1% 盐酸酒精分化 ,1% 碳酸锂蓝化 , 树脂封片。置于显微镜下观察并拍照。阴性对照用 PBS 代替一抗处理。

1.2.3 Western blot 检测 在 RIPA 裂解液中将食管组织粉碎匀浆 ,4 °C 条件下 15 000 r/min 离心 30 min ,提取上清液总蛋白 ,提取的总蛋白用改良型 Bradford 法蛋白浓度定量试剂盒测定浓度。总蛋白在 10% 聚丙烯酰胺中凝胶电泳后 ,将其电转至 PVDF 膜 ,室温下用 5% 脱脂奶粉 ,溶于膜清洗液中封闭 PVDF 膜 2 h 后 ,加入兔抗人 Twist1 多克隆抗体(稀释 1 : 1 000) ,4 °C 冰箱内摇床过夜 ,膜清缓冲液洗脱 3 遍 ,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (稀释 1 : 2 500) ,37 °C 条件下摇床结合反应 2 h ,洗膜 3 遍 ,将膜与电化学发光检测剂结合后显影 , GAPDH 蛋白作为内参照 ,采用 Alphaview FC3 分析软件扫描分析目的蛋白的表达量。

1.3 结果判定

1.3.1 免疫组化结果判定 Twist1 阳性信号为棕褐色 ,主要位于细胞核。参照文献^[8]报道 ,Kawasaki 的半定量积分法即如果判定: 光学显微镜下 ,细胞中出现淡黄至棕黄色颗粒的为阳性细胞。每例标本随机观察 10 个含有阳性细胞的高倍镜视野(×400) ,按阳性细胞数在每高倍镜视野下的百分比计分: 阳性细胞 < 10% 为 0 分; 阳性细胞 10% ~ 25% 为 1 分; 阳性细胞 26% ~ 50% 为 2 分; 阳性细胞 > 50% 为 3 分。染色强度评分方法: 无色阴性(-) 为 0 分; 浅黄色(+) 为 1 分; 棕黄色(++) 为 2 分; 黄褐色(+++) 为 3 分。综合评定依据为两分值相乘。0 ~ 2 分为阴性(-) ; 3 ~ 5 分为弱阳性(+) ; 5 ~ 7 分为中度阳性(++) ; > 7 分为强阳性(+++)。

1.3.2 Western blot 结果判定 用 Alphaview FC3 分析软件计算各条带灰度值 ,Twist1 表达为 Twist1 条带灰度值 / GAPDH 条带灰度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。Twist1 在各组中表达阳性率比较采用 χ^2 检验 ,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。Western blot 实验数据进行方差分析 ,Bonfferoni 法进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测

2.1.1 Twist1 在各组中的表达 Twist1 表达的细胞定位主要在细胞核 ,少量表达在细胞质。正常食管组织 73 例 ,Twist1 阳性表达 28 例 ,阳性表达率

38.4% ; 癌旁组织 67 例 ,Twist1 阳性表达 33 例 ,阳性表达率 49.3% ; 食管鳞癌组织 75 例 ,Twist1 阳性表达 56 例 ,阳性表达率 74.7% ,经统计分析 ,Twist1 在 3 组中阳性表达率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 20.710 ,P = 0.000$)。3 组间两两比较 ,食管鳞癌组织中的阳性表达率明显高于正常食管组织($\chi^2 = 19.872 ,P < 0.05$) 和癌旁组织($\chi^2 = 9.769 ,P < 0.05$) ; 正常食管组织、癌旁组织组间比较差异无统计学意义。

2.1.2 Twist1 在食管鳞癌的表达与临床病理学的关系 在不同的肿瘤细胞分化程度、临床分期、T 分期(浸润程度) 组间 ,食管鳞癌 Twist1 的阳性表达率差异有统计学意义($P < 0.05$) ,在不同性别、年龄、肿瘤部位、有无淋巴结转移组间差异无统计学意义 ,见表 1、图 1。

表 1 食管鳞癌中 Twist1 与临床病理学特征的关系 [n(%)]

项目	n	Twist1 阳性	χ^2 值	P 值
性别				
男	54	39(72.2)	0.609	0.321
女	21	17(81.0)		
年龄(岁)				
> 60	54	43(79.6)	2.511	0.100
≤ 60	21	13(61.9)		
肿瘤部位				
上段	19	15(78.9)	0.562	0.755
中段	34	24(70.1)		
下段	22	17(77.1)		
分化程度				
低分化	27	25(92.1)	7.167	0.006
高 - 中分化	48	31(64.6)		
T 分期				
T1 ~ T2	37	22(59.5)	8.928	0.003
T3 ~ T4	38	34(89.5)		
临床分期				
I ~ II a	42	26(61.9)	8.219	0.004
II b ~ IV	33	30(90.9)		
淋巴结转移				
有	36	26(72.2)	0.219	0.420
无	39	30(76.9)		

2.2 Western blot 食管鳞癌组织在 25 ku 附近有明显 Twist1 蛋白表达的条带 ,见图 2。正常食管组织 Twist1 相对表达量(0.28 ± 0.27)、癌旁组织为(0.34 ± 0.31)、食管鳞癌组织为(0.50 ± 0.35) ,3 组间 Twist1 相对表达量差异有统计学意义($F = 6.263 ,P = 0.002$) ,正常食管组织、癌旁组织分别与食管鳞癌组织比较 ,Twist1 相对表达量差异有统计学意义($P < 0.05$) ,正常食管组织与癌旁组织比较 ,

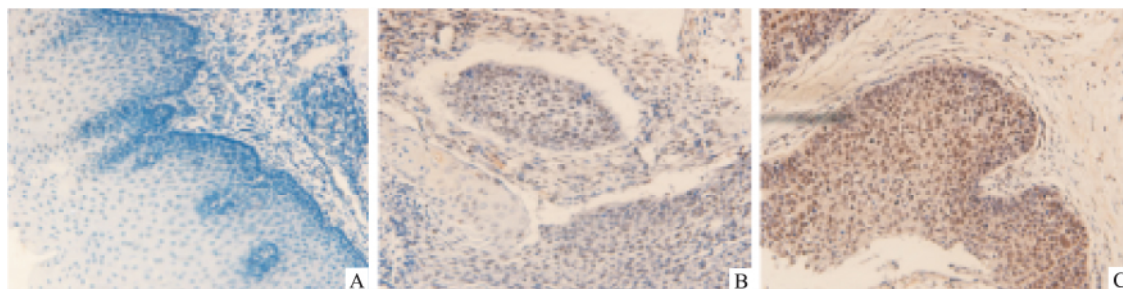


图1 各组食管黏膜组织 IHC 染色 ×200

A: 正常食管组织; B: 癌旁组织; C: 食管鳞癌组织

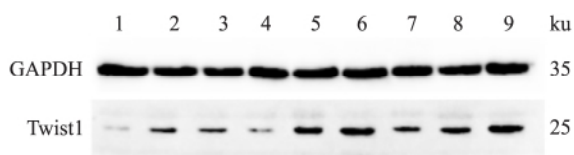


图2 Western blot 法检测3组食管组织中 Twist1 的表达

1、4、7: 正常食管组织; 2、5、8: 癌旁组织; 3、6、9: 食管鳞癌组织

差异无统计学意义。实验结果与免疫组化结果吻合。

3 讨论

作为食管癌最重要的生物学特性,肿瘤细胞的侵袭和转移是引起其常规治疗后患者复发和死亡的重要因素之一。癌症的进展和转移与肿瘤的微环境有关^[9]。肿瘤细胞 EMT 是肿瘤发展中的关键步骤之一,EMT 也是上皮源性肿瘤获得侵袭性的早期事件^[10]。而 Twist1 作为 bHLH 家族的转录因子,1983 年在果蝇中首先发现^[11],是中胚层发育中诱导细胞迁移的重要转录因子,幼虫出生后 Twist1 降至最低水平。目前已证实 Twist1 在多种人类上皮源性肿瘤中被发现有表达异常,如乳腺癌^[4]、胃癌^[5]、卵巢癌^[6]等。Twist1 是 EMT 过程关键的调控因子之一^[12],可能通过 Akt^[13]、Wnt1^[14]、抑制 p53 蛋白活性^[15]等途径,诱导 EMT 发生,参与肿瘤侵袭、转移的过程。

本实验结果显示, Twist1 蛋白在食管癌中的阳性表达率 74.7% (56/75),与正常食管组织 38.4% (28/73) 和食管癌旁组织 49.3% (33/67) 比较, Twist1 在食管癌组织中的表达明显增高,两种实验方法得出结论较为一致。其提示食管癌组织中, Twist1 可能参与了食管癌肿瘤细胞的上皮原间质转化,从而促进肿瘤细胞的发生。本研究显示肿瘤细

胞越异型, Twist1 蛋白表达越强(染色深);而异型小的肿瘤细胞 Twist1 蛋白表达弱(染色浅)。本实验结果提示 Twist1 在食管鳞状细胞癌中的阳性表达率随着肿瘤细胞的分化程度的降低,对应的呈现出增高的趋势;同时伴随肿瘤浸润程度的不断增高, Twist1 也呈现出增高的趋势,这提示 Twist1 在食管癌发生发展过程中起到一定的作用,同侵袭及恶化的过程有一定的关系。这和乳腺癌^[4]、胃癌^[5]和前列腺癌^[16]的研究结果相似。

食管癌的发生、侵袭和转移是多因素相互作用的复杂病理过程,本研究表明 Twist1 参与肿瘤的浸润和转移,检测其有助于食管鳞癌的诊断、判断其恶性程度, Twist1 很可能是食管癌发生发展中重要的分子标志物或有效的治疗靶点。随着对 Twist1 研究的深入,其调控及其作用机制会逐渐明朗。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin 2016, 66(6): 115-32.
- [2] Merkow R P, Bilimoria K Y, Keswani R N, et al. Treatment trends, risk of lymph node metastasis, and outcomes for localized esophageal cancer[J]. J Natl Cancer Inst 2014, 106(7): 133-40.
- [3] Thisse B, Stoetzel C, Gorostiza-Thisse C, et al. Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early Drosophila embryos[J]. EMBO J, 1988, 7(7): 2175-83.
- [4] Wang B, Lindley L E, Fernandez-Vega V, et al. The T box transcription factor TBX2 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion of normal and malignant breast epithelial cells[J]. PLoS One 2012, 7(7): e41355.
- [5] Sung C O, Lee K W, Han S, et al. Twist1 is up-regulated in gastric cancer-associated fibroblasts with poor clinical outcomes[J]. Am J Pathol, 2011, 179(4): 1827-38.
- [6] Kajiyama H, Hosono S, Terauchi M, et al. Twist expression predicts poor clinical of patients with clear cell carcinoma of the ovary[J].

- Oncology 2006 ,71(5 - 6) : 394 - 401.
- [7] Eckert M A ,Lwin T M ,Chang A T , et al. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis [J]. *Cancer Cell* 2011 , 19(3) : 372 - 86.
- [8] 温丰标,杨 洋,刘东雷,等. 自噬在胰岛素促进顺铂诱导 EC9706 细胞凋亡中的作用 [J]. *中华实验外科杂志* 2013 ,30 (12) : 2625 - 7.
- [9] Liotta L A ,Kohn E C. The microenvironment of the tumour-host interface [J]. *Nature* 2001 ,411(683) : 375 - 9.
- [10] Lee J M ,Dedhar S ,Kalluri R , et al. The epithelial mesenchymal transition: new insights in signaling , development , and disease [J]. *J Cell Biol* 2006 ,172(7) : 973 - 81.
- [11] Otto S J ,Fracheboud J ,Looman C W , et al. Initiation of population-based mammography screening in Dutch municipalities and effect on breast-cancer mortality: a systematic review [J]. *Lancet* , 2003 ,361(9367) : 1411 - 7.
- [12] Kang Y ,Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis [J]. *Cell* 2004 ,118(3) : 277 - 9.
- [13] Li J ,Zhou B P. Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters [J]. *BMC Cancer* 2011 ,11: 49 - 54.
- [14] Howe L R ,Watanabe O ,Leonard J , et al. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation [J]. *Cancer Res* , 2003 ,63(8) : 1906 - 13.
- [15] Piccinin S ,Tonin E ,Sessa S , et al. A “twist box ” code of p53 inactivation: twist box: p53 inactivation promotes p53 degradation [J]. *Cancer Cell* 2012 ,22(3) : 404 - 15.
- [16] 徐利泉,熊正文,李 伟,等. 前列腺癌组织中 Twist 和缺氧诱导因子-1 α 的表达及意义 [J]. *解放军医药杂志* 2012 ,24(3) : 24 - 7.

Expression of Twist1 in esophageal carcinoma and its clinical significance

Liu Shandong , Huang Yunlong , Fang Yanxin , et al

(Dept of Thoracic Surgery , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To study Twist1 expression in esophageal squamous cell carcinoma , and to explore its role and clinical significance in the process of esophageal cancer. **Methods** Immunohistochemical method and Western blot were used to detect Twist1 expression in normal esophageal tissue , para-carcinoma tissue (from cancer organizations within 2 cm) and esophageal squamous carcinoma tissues , and elucidated its relationship with gender , age , tumor location , degree of cell differentiation , clinical stage and lymph node metastasis. **Results** The positive expression rate of Twist1 in esophageal squamous carcinoma tissue(74. 7%) was obviously higher than that in para-carcinoma tissue (49. 3%) and normal esophageal tissue (38. 4%) ($P = 0. 000$). The positive expression rate of Twist1 in esophageal squamous cell carcinomas of their different cell differentiation , clinical stage , T stage between the groups , the difference was statistically significant ($P < 0. 05$) , there was no statistically significant difference between the different gender , age , tumor location and lymph node metastasis groups. Relative expression levels of Twist1 difference between groups of normal esophageal tissue para-carcinoma tissue and esophageal squamous carcinoma tissues was statistically significant ($F = 6. 263$, $P = 0. 002$). **Conclusion** Twist1 may be involved in the occurrence and development and malignant transformation process of esophageal squamous cell carcinoma , detection of Twist1 contributes to the diagnosis of esophageal squamous cell carcinomas , and help to determine its malignant degree.

Key words Twist1 transcription factor; esophageal neoplasms; Western blot; immunohistochemical