

TWIST 基因和蛋白与宫颈癌发生发展关系的研究

朱志平¹, 张一鸣^{2*}

(¹ 溧阳市妇幼保健院检验科, 江苏 溧阳 213300; ² 南京医科大学附属常州妇幼保健院检验科, 江苏 常州 213003)

[摘要] **目的:**检测 TWIST 基因在宫颈癌组织和宫颈正常组织中的表达,探讨其与宫颈癌发生、发展的相关性以及在宫颈癌诊疗中的意义。**方法:**收集 56 例宫颈癌组织和 35 例宫颈正常组织,用实时定量 PCR 检测 TWIST mRNA 的表达;用 Western blot 检测 TWIST 蛋白的表达,并分析 TWIST mRNA 在宫颈癌中的表达水平与临床病理因素及高危型 HPV 病毒载量相关性。**结果:**实时定量 PCR 结果显示宫颈癌组织中 TWIST mRNA 表达高于宫颈正常组织,差异具有统计学意义($P < 0.01$);Western blot 在蛋白质水平上证实了这一点($P < 0.01$)。宫颈癌组织中 TWIST 的表达与淋巴结转移相关($P = 0.022$),但与年龄、FIGO 分期、肿瘤大小、病理类型、肿瘤分化程度无关(P 均 > 0.05),Logistic 回归分析显示,高水平的 TWIST mRNA 表达是淋巴结转移的独立危险因素($P < 0.05$)。而 TWIST 基因的相对表达水平与高危型 HPV 病毒载量无相关性($r = 0.205, P > 0.05$)。**结论:**宫颈癌组织中 TWIST 的表达上调,且与是否有淋巴结转移相关,TWIST 的表达可能对宫颈癌的发生、发展及转移有重要作用。

[关键词] TWIST 基因;宫颈癌;人乳头瘤病毒

[中图分类号] R737

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)09-1192-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20140908

Significance of TWIST gene and protein in the occurrence and development of cervical cancer

Zhu Zhiping¹, Zhang Yiming^{2*}

(¹Department of Clinical Laboratory, Liyang Maternal and Child Health Care Hospital, Liyang 213300; ²Department of Clinical Laboratory, Changzhou Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213003, China)

[Abstract] **Objective:**To detect the expression of TWIST gene in cervical cancer and normal cervical tissues, explore the correlation between TWIST gene and the development of cervical cancer, and assess the clinical application of TWIST gene detection for cervical cancer diagnosis. **Methods:**The primary tumor tissues from 56 cervical cancer patients and 35 normal cervical tissues were collected. The expression of TWIST mRNA was detected by Real-time PCR. TWIST protein levels were determined by Western blot. The correlation analysis was conducted to assess the relationship between TWIST expression and clinical pathological parameters, load of high risk human papilloma virus (HPV). **Results:**The results of Real-time PCR showed that the expression rate of TWIST gene in the cervical cancer tissues was significantly higher than that in normal cervical tissues ($P < 0.01$), which was verified by the expression of TWIST protein levels detected by Western blot ($P < 0.01$). TWIST expression in the cervical cancer tissues was correlated with lymph node metastasis ($P = 0.02$), but not with age, FIGO stage, tumor size, pathological type and the differentiation grade of tumor (both $P > 0.05$). Logistic regression analysis showed that high level of TWIST mRNA expression was an independent risk factor for lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was no correlation between TWIST expression and load of high risk HPV in the cervical cancer group ($r = 0.205, P > 0.05$). **Conclusion:**TWIST expression in the cervical cancer tissues was up-regulated, and associated with lymph node metastasis. It may play an important role in the pathogenesis and metastasis of cervical cancer.

[Key words] TWIST gene; cervical cancer; human papilloma virus

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(09): 1192-1195]

[基金项目] 常州市卫生局指导性科技项目(WZ201120);南京医科大学科技发展基金面上项目(2011NJMU109)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zmzw0701@163.com

宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一。已经明确人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染是宫颈癌发生的高危因素; 然而, 只有不足 1% 进展为宫颈癌, 提示宫颈癌具有复杂的致病机制^[1]。TWIST 基因属于碱性螺旋-环-螺旋蛋白家族中高度保守的转录因子, 参与胚胎的发生、发展以及一些肿瘤的形成、侵袭、转移等过程^[2], TWIST 基因与宫颈癌的关系国内外只有零星报道, 本文拟从基因和蛋白的角度探讨 TWIST 在宫颈癌的发生、发展中的作用, TWIST 表达与临床病理参数及高危型 HPV 病毒载量的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象

收集 2010 年 3 月~2011 年 12 月溧阳市妇幼保健院和常州市妇幼保健院妇科手术切除的宫颈癌患者组织 56 例, 其中鳞癌 46 例, 腺癌 10 例, 年龄 21~68 岁, 平均年龄 46 岁, 术前均未接受化疗和放疗。同期收集无宫颈疾病而行子宫全切的正常宫颈组织或因宫颈炎行宫颈活检病理证实为正常宫颈的组织标本 35 例为对照组, 年龄 22~66 岁, 平均年龄 46 岁, 所有患者均知情同意, 手术取材后立即置于-70℃冻存备用, 所有病例均经病理检查确诊。

PCR 仪 (2720, ABI 公司, 美国)、实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96, Bio-Rad 公司, 美国)、核酸蛋白测定仪 (Eppendorf 公司, 美国)、TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司, 美国)、逆转录试剂盒 (Fermentas 公司, 美国)、实时定量 PCR 检测试剂盒 (Toyobo 公司, 日本)、总蛋白质提取试剂盒 (上海申能博彩公司)、鼠抗人 TWIST 抗体 (批号: ab50887, Abcam 公司, 美国)、HRP 标记的羊抗鼠 IgG、鼠抗人 β -actin 抗体 (上海碧云天公司)、DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥)、第二代杂交捕获技术 (HC-2) HPV-DNA 检测试剂盒 (Digene 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和逆转录

取 50~100 mg 组织, 放入匀浆器中并加入 1 ml TRIzol 提取 RNA, 核酸蛋白测定仪测定 RNA 样品浓度, 取 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 在 1.8~2.0 之间、且琼脂糖凝胶电泳鉴定质量好的 RNA 标本进行逆转录。按逆转录试剂盒说明书操作, 以 oligo(dT) 为引物, 合成 cDNA。

1.2.2 引物设计

根据 GenBank 已知基因序列编号 (TWIST:

NM_000474.3, β -actin: NM_001101.3) 设计引物, 由上海生工公司合成, TWIST 基因正向引物: 5'-ACGAGCTGGACTCCAAGATG-3', 反向引物: 5'-GGC-ACGACCTCTTGAGAATG-3', 产物长度为 484 bp。 β -actin 正向引物: 5'-CACGAACTACCTTCAACTC-C-3', 反向引物: 5'-CATACTCCTGCTTGCTGATC-3', 产物长度为 265 bp。

1.2.3 Real-time PCR

常规方法构建 TWIST 基因标准质粒^[3], 稀释成 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ copies/ μl 浓度, 构建标准曲线。反应总体积 20 μl , 包括 2 \times SYBR Green Master Mix 10 μl 、cDNA 模板 1 μl , 正、反向引物各 0.5 μl (10 $\mu\text{mol/L}$), ddH₂O 8 μl 。PCR 循环参数为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, TWIST (60℃)/ β -actin (56℃) 退火 30 s, 72℃延伸 30 s, TWIST (82℃)/ β -actin (84℃) 8 s 后采集荧光, 共 35 个循环, 每个样本重复测定 3 次。由荧光定量 PCR 仪附带软件测定并绘制标准曲线。TWIST 相对表达水平 = TWIST cDNA 拷贝数/ β -actin cDNA 拷贝数。

1.2.4 Western blot

剪碎 20~40 mg 组织, 加入蛋白质裂解液 (RIPA)、蛋白酶抑制剂 (PMSF), 匀浆器匀浆提取总蛋白质, 核酸蛋白测定仪上测定 $D(280\text{ nm})$ 浓度; SDS-PAGE 80 V 30 min, 100 V 1.5 h 分离蛋白质; 350 mA 2 h 电转移至 PVDF 膜上, 50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h; 将膜与鼠抗人 TWIST 抗体 (1:25) 室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 与 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:3 000) 室温孵育 1 h; 以鼠抗人 β -actin 抗体 (1:1 000) 为内参, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:3 000), 反应后用 ECL 发光剂显示阳性条带, 用 Typhoon 分子成像系统分析灰度, 计算 TWIST/ β -actin 灰度比值, 试验重复 3 次。

1.2.5 高危型 HPV 检测

用第二代杂交捕获技术 (HC-2), 按 HC-2 HPV-DNA 试剂盒说明书操作, 使全长探针与病毒 DNA 杂交, 通过抗体捕获信号放大, 在分子水平对病毒 DNA 进行定性及定量分析, 检测目前已知的 13 种致癌型 HPV DNA (即 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68 型), ≥ 1.0 pg/ml 判为阳性。

1.3 统计学方法

用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。TWIST 的相对表达量经正态性检验服从近似正态分布, 采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多因素分析采用 Logistic 回归检验, 计算比值比 (OR

值)及95%的可信区间(CI)。高危型HPV病毒载量以中位数(四分位数间距)表示,相关性用Spearman相关分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Real-time PCR检测TWIST在宫颈癌组织和宫颈正常组织中的表达

TWIST和 β -actin基因的标准曲线由荧光定量PCR仪附带软件绘制,相关系数(r)分别为0.996和0.999。56例宫颈癌患者癌组织中TWIST mRNA的相对表达水平 $(6.53 \pm 1.25) \times 10^{-3}$ 高于宫颈正常组织 $(1.98 \pm 0.48) \times 10^{-3}$,差异具有统计学意义($t = 20.6, P < 0.01$,图1)。

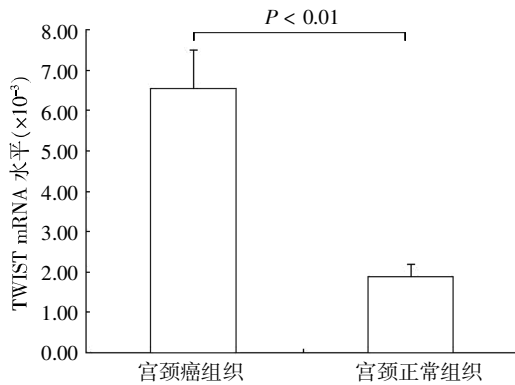


图1 Real-time PCR检测宫颈癌和宫颈正常组织中TWIST mRNA的相对表达水平

Figure 1 The relative expression level of TWIST mRNA in cervical cancer and normal cervical tissues by Real-time PCR

2.2 TWIST蛋白在宫颈癌和宫颈正常组织中的表达

TWIST蛋白的分子量为21 000,内参 β -actin的分子量为44 000,宫颈癌组织中TWIST蛋白表达水平 (3.02 ± 0.40) 高于宫颈正常组织 (1.92 ± 0.12) ,差异具有统计学意义($t = 15.8, P < 0.01$,图2)。

2.3 宫颈癌组织中TWIST mRNA相对表达量与临床病理参数的关系

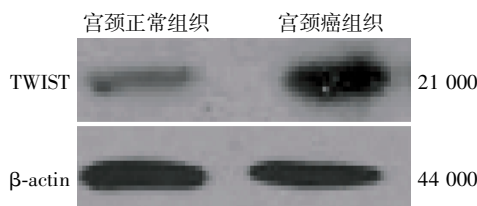


图2 Western blot检测宫颈癌和宫颈正常组织中TWIST蛋白的表达

Figure 2 The expression of TWIST protein in cervical cancer and normal cervical tissues by Western blot

Real-time PCR检测所得TWIST mRNA相对表达量与淋巴结是否转移相关($t = 2.07, P = 0.022$),但与年龄、FIGO分期、肿瘤大小、病理类型、肿瘤分化程度(t 分别为0.27、1.31、0.57、1.36、1.55, P 均 > 0.05)无关(表1);经Logistic回归分析,TWIST mRNA相对表达量对淋巴结是否转移的OR值为1.96(95%CI:1.35~3.63, $P < 0.05$)。

表1 宫颈癌组织中TWIST相对表达量与临床病理参数的关系

Table 1 The relationship of TWIST mRNA expression level with clinicopathologic parameters

观察指标	例数	TWIST相对表达量($\times 10^{-3}$)	t 值	P 值
年龄(岁)			0.27	0.393
≤46	25	6.50 ± 1.22		
>46	31	6.59 ± 1.23		
FIGO分期			1.31	0.097
I期	22	6.25 ± 1.23		
II期	34	6.71 ± 1.34		
肿瘤大小(cm)			0.57	0.284
<4	38	6.65 ± 1.26		
≥4	18	6.45 ± 1.12		
病理类型			1.36	0.089
鳞癌	46	6.87 ± 1.32		
腺癌	10	6.25 ± 1.22		
分化程度			1.55	0.064
中、高分化	36	6.42 ± 1.35		
低分化	20	7.02 ± 1.46		
淋巴结转移			2.07	0.022
有	16	6.98 ± 1.46		
无	40	6.22 ± 1.15		

2.4 宫颈癌组中TWIST与高危型HPV病毒载量的关系

Spearman相关分析表明,宫颈癌组中TWIST的mRNA的相对表达水平与高危型HPV病毒载量无相关性($r = 0.205, P > 0.05$)。

3 讨论

宫颈癌的发生、发展是一个多因素、多步骤的过程,目前认为高危型人乳头瘤病毒感染是宫颈癌的主要致病因素,但其他一些癌基因、抑癌基因也在宫颈癌的发生、发展中发挥重要作用。TWIST蛋白是一个高度保守的转录因子,首先在果蝇中被发现,其对胚胎发育过程的细胞重建及细胞迁移有重要作用,在上皮细胞向间质细胞的转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中起着关键的调控作用,引发了研究者对肿瘤事件中TWIST基因作用的

高度关注^[4-5]。目前已在多种人类上皮来源的肿瘤中发现 TWIST 表达增高, 并与患者预后关系密切, 如乳腺癌、肝细胞癌、前列腺癌、胃肠道肿瘤等。近年来成为研究肿瘤侵袭、转移机制的热点之一^[6-10]。

本研究通过 Real-time PCR 检测 56 例宫颈癌和 35 例宫颈正常组织中 TWIST 的表达, 发现宫颈癌组织 TWIST mRNA 表达高于宫颈正常组织 ($P < 0.01$), Western blot 在蛋白水平上证实了这一点。TWIST 是 EMT 过程中的重要调控因子, TWIST 通过 EMT 促使肿瘤细胞发生形态功能变化, 其机制可能是结合 E-cadherin 基因启动子上的 E-box 序列, 从而抑制其转录表达, 使由 E-cadherin 调控的细胞黏附作用失效, 上皮细胞的多形性改变和去分化表现是肿瘤演进的标志^[11-12]。TWIST 在宫颈癌组织中高表达, 提示 TWIST 与宫颈癌的发生密切相关。本研究还对 TWIST 相对表达量与临床病理资料间关系进行了分析, 发现 TWIST 表达水平与淋巴结转移相关, 有淋巴结转移组的表达水平高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$), 但与年龄、分化状态、肿瘤大小无关, 不能为宫颈癌的病理类型、临床分期提供依据, 说明 TWIST 不仅参与了宫颈癌的发生, 还可能与宫颈癌的侵袭和转移密切相关。Logistic 回归分析显示, 高水平的 TWIST mRNA 表达是淋巴结转移的独立危险因素 ($P < 0.05$)。对 TWIST 的表达水平与高危型 HPV 病毒载量的相关分析发现, 宫颈癌组 TWIST 的相对表达水平与高危型 HPV 病毒载量无相关性 ($r = 0.205, P > 0.05$), 表明 TWIST 和 HPV 可能是各自通过不同的通路促进宫颈癌的发生、发展。

综上所述, TWIST 在宫颈癌中的表达增加, 且与是否有淋巴结转移相关, TWIST 的异常表达可能对宫颈癌的发生、发展及转移有重要作用。

[参考文献]

[1] Parkin DM, Bray F. Chapter 2: the burden of HPV related cancers [J]. Vaccine, 2006, 24(Suppl3): 11-25
[2] Ding J, Zhang ZM, Pan Y, et al. Expression and significance of Twist, E-cadherin, and N-cadherin in gastrointestinal stromal tumors [J]. Dig Dis Sci, 2012, 57 (9):

2318-2324
[3] DeGraves FJ, Gao D, Kaltenboeck B. High-sensitivity quantitative PCR platform [J]. Biotechniques, 2003, 34 (7): 106-115
[4] Parvani JG, Schiemann WP. Sox4, EMT programs, and the metastatic progression of breast cancers: mastering the masters of EMT [J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(4): 72-76
[5] Yu L, Mu Y, Sa N, et al. Tumor necrosis factor α induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis via NF- κ B signaling pathway-mediated TWIST expression in hypopharyngeal cancer [J]. Oncol Rep, 2014, 31(1): 321-327
[6] Bohm J, Sustmann C, Wilhelm C, et al. TWIST is directly activated by TCF/LEF in the canonical Wnt signalling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 348 (3): 898-907
[7] Wu Q, Chen X, Zhang J, et al. TWIST interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells [J]. J Biol Chem, 2006, 281(34): 24090-24094
[8] Li Y, Wang W, Wang W, et al. Correlation of TWIST2 up-regulation and epithelial-mesenchymal transition during tumorigenesis and progression of cervical carcinoma [J]. Gynecol Oneol, 2011, 124(11): 112-118
[9] Fan CC, Wang TY, Cheng YA, et al. Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(10): 1735-1744
[10] Kuo CH, Chen KF, Chou SH, et al. Lung tumor-associated dendritic cell-derived resistin promoted cancer progression by increasing Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1/Twist pathway [J]. Carcinogenesis, 2013, 34 (11): 2600-2609
[11] Dasgupta P, Rizwani W, Cheng AN, et al. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines [J]. Int J Cancer, 2009, 124(1): 36-45
[12] Yu Q, Zhang K, Wang X, et al. Expression of transcription factors snail, slug, and twist in human bladder carcinoma [J]. Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(9): 119

[收稿日期] 2013-12-13