

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.08.006

文章编号: 1005-8982(2016)08-0028-05

论著

Twist 蛋白在结直肠癌中的表达水平 及其促进癌症发展的机制研究

王琳

(河南省郑州人民医院 放疗科,河南 郑州 450000)

摘要:目的 研究 Twist 蛋白在结直肠癌中的表达水平,其对结直肠癌细胞的增殖以及侵袭能力的影响,并探讨其促进癌症发展具体的机制。**方法** 经结肠镜活检取 20 例患者组织和 20 例正常人的标本,采用实时定量 PCR 的方法检测了 Twist 的 mRNA 表达水平。采用脂质转染法对结直肠癌细胞系 CT-26 细胞进行 RNA 干扰,采用 CCK-8 法及 transwell 法观察干扰 Twist 后对结直肠癌细胞的增殖以及侵袭能力的影响;采用 RT-PCR 以及 Western blot 检测了 CT-26 细胞中 MMP-9 的 mRNA 及蛋白水平。**结果** Twist 在结直肠癌组织中的 mRNA 水平显著高于对应癌旁组织以及对照组 ($P < 0.05$);在伴有淋巴结转移的癌组织中 Twist mRNA 的表达水平显著高于无淋巴结转移的组织 ($P < 0.05$);与转染对照组比较, Twist siRNA 转染的 CT-26 细胞增殖水平及迁徙能力均显著降低 ($P < 0.05$);干扰 Twist 的 CT-26 细胞能够显著降低金属蛋白酶 MMP-9 mRNA 及蛋白的水平。**结论** Twist 蛋白能够增加结直肠癌细胞的增殖及迁徙能力,其影响机制可能与金属蛋白酶 MMP-9 有关。

关键词: Twist 蛋白;结直肠癌;MMP-9;增殖;侵袭;机制

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

Expression of Twist protein in colorectal cancer and mechanism of its cancer promoting effect

Lin Wang

(Department of Radiotherapy, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: Objective To explore the expression of Twist protein in colorectal cancer and its impact on the proliferation and invasion of colorectal cancer cells, and to clarify the mechanism of its cancer promoting effect. **Methods** Twenty tissue specimens were selected from colorectal cancer patients and normal people through colonoscopy biopsy, respectively, then the expression of Twist mRNA was detected through real time quantitative PCR method. The colorectal cancer cell line CT-26 cell was RNA interfered by lipid transfection method, and was observed the impact of Twist after interference on the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by CCK-8 method and transwell method, and the expression of mRNA and protein of MMP-9 in CT-26 cell were detected by RT-PCR and Western blot method. **Results** The expression of Twist mRNA in colorectal cancer tissues was significantly higher than in para-carcinoma tissues the control group ($P < 0.05$). The expression of Twist mRNA in colorectal cancer tissues with lymph node metastasis was significantly higher than in colorectal cancer tissues without lymph node metastasis ($P < 0.05$). Compared with transfection control group, the proliferation and migration ability of CT-26 cells transfected by Twist siRNA were significantly decreased ($P < 0.05$). CT-26 cells interfering Twist reduced the expression of mRNA and protein of metal protease MMP-9. **Conclusions** Twist protein strengthens the proliferation and migration ability of colorectal cancer cells, and the mechanism may relate with metal protease MMP-9.

Keywords: twist protein; colorectal cancer; MMP-9; proliferation; invasion; mechanism

收稿日期: 2015-11-06

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化道恶性肿瘤,目前,我国结直肠癌的发病率居第 3 位,其病死率居第 4 位,且该病的患者群逐渐趋向年轻化^[1]。因此,深入探讨结直肠癌发病及转移的分子机制,寻找新的治疗靶点,对治疗结直肠癌具有重要的意义。Twist 蛋白是碱性螺旋-环-螺旋家族的转录因子之一,已有大量的研究表明,其在促进上皮-间质转变,参与实体肿瘤的远处器官转移及癌旁结节形成中发挥重要的作用^[2-5]。国外学者 Valdes-Mor 等发现, Twist 过度表达与男性原发性大肠癌的淋巴结浸润密切相关^[6],然而至今,结直肠癌患者中 Twist 的表达水平以及其对结直肠癌细胞的增殖及迁移影响的研究尚无报道。因此,本研究旨在探讨 Twist 在结直肠癌组织中的表达情况,并从体外通过低表达结直肠癌细胞系中的 Twist 水平来探讨其影响结直肠癌迁移的分子机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

所有结直肠癌组织来源于 2013 年 8 月-2014 年 1 月来郑州人民医院就医患者的手术切除标本。癌变组共 20 例,其中,男性 11 例,女性 9 例;年龄 57~73 岁,平均(62.2±6.6)岁。所有组织标本经术后病理学证实为结直肠癌,分别取结直肠癌及对应肿瘤边缘 2~6 cm 处癌旁组织进实验分析。对照组取同期医院检查的正常 20 例人群结直肠黏膜组织,其中,男性 12 例,女性 8 例,年龄 60~72 岁,平均(63.52±7.53)岁。

1.2 结直肠癌组织以及血浆标本总 RNA 提取及逆转录反应(PT-PCR)

取结直肠癌及对应癌旁组织约 100 mg 组织后,加入 1 ml 的 Trizol(美国 Invitrogen 公司)充分匀浆,将抽提的总 RNA 溶于 30 μl DEPC 水溶液。提取的总 RNA 经紫外分光光度计进行定量分析,并采用 Femantes 逆转录试剂盒进行逆转录,cDNA 产物-20℃冰箱保存备用。荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Roche 公司,本实验使用美国 ABI 公司的 7300 型号 Real-Time PCR 仪器进行扩增,PCR 反应条件:95℃变性 20 s,然后 60℃ 20 s 和 70℃ 1 s 进行 40 个循环,使用 2^{-ΔΔCt}法进行相对定量分析结果。RT-PCR 序列:基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotein 9, MMP-9):正向引物:CGCAGACATCGT-

CATCCAGT,反向引物:GGATTGGCCTTGAAGAT-GA; Twist:正向引物:CACGCAGTCGCTGAACGA,反向引物:GACCTGGTACAGGAAGTCGATGT; GAPDH:正向引物:AACTGGGACGACATGGAGAA,反向引物:ATACCCCTCGTAGATGGGCA。

1.3 细胞转染

小鼠大肠癌细胞 CT-26 细胞采用完全 DMEM 培养液培养,待汇合度达到 50%~60%左右。采用脂质体 Lipofectamine[®] 2000 (美国 Invitrogen 公司)对小鼠大肠癌细胞 CT-26 细胞中 Twist 进行小 RNA 干扰, Twist 的 siRNA 靶向序列为 5'-GGUACAUC-GACUUCUGUATT; 对照序列为 5'-UCAUAAGUG AUGCUGGAGCTT⁷。待干扰 48 h 后,采用 RT-PCR 技术验证转染效率。

1.4 细胞迁移实验

取对数生长期的结肠癌细胞并调整细胞密度至 2×10⁵~3×10⁵个/ml,按 0.1 ml/孔加入到 transwell 小室的上层,小室下层加入 1 ml 的 10%血清的培养液。培养 24 h 时间后,对已迁移至小室下层的细胞进行计数(×200 倍)。

1.5 CCK-8 试剂检测细胞增殖

按 CCK-8 试剂(上海前生生物科技有限公司)说明书进行分析。分别收集未处理组和转染组的 24 h, 48 h 和 72 h 后的 CT-26 细胞,加入终浓度为 10%的 CCK-8 试剂,于 37℃培养箱中继续孵育 3 h,然后测定 450 nm 的光密度(optical density, OD)值。

1.6 免疫印迹法(Western blot)检测蛋白水平

细胞收取后,加入 1×SDS 细胞裂解液,进行 SDS-PAGE 电泳,110 V 电压转膜 100 min,37℃封闭后,加兔抗人的 MMP-9(美国 Biolegend 公司)4℃孵育过夜后,HRP 标记的小鼠抗兔二抗(南京生兴生物公司)(1:1 000 稀释)37℃孵育 50 min,内参蛋白选用美国 Sigma 公司的抗人 β-actin (1:5 000 稀释),孵育后用 PBS-T 洗膜 3 次,进行免疫印迹化学发光(ECL)检测。

1.7 统计学方法

所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均通过正态性检验。两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间比较为单因素方差分析+两两多重比较(LSD-t 检验)。多时点资料的比较则为单因素重复测量方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌组织及对应癌旁组织 *Twist* mRNA 表达水平

3 组的 *Twist* mRNA 表达水平,整体比较差异有统计学意义($F=128.590, P=0.000$)。与正常组织比较,结直肠癌癌旁组织中 *Twist* mRNA 水平显著增高,差异有统计学意义($t=4.547, P=0.000$);与癌旁组织比较,结直肠癌组织中 *Twist* mRNA 的表达水平显著增高,差异有统计学意义($t=11.045, P=0.000$),见表 1。

表 1 结直肠癌及对应癌旁组织中 *Twist* mRNA 表达水平 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>Twist</i> mRNA	F 值	P 值
A: 正常组织	1.24 ± 0.41		
B: 癌旁组织	2.41 ± 0.57	128.590	0.000
C: 结直肠癌组织	5.25 ± 1.22		
A VS C(<i>t</i> 值, <i>P</i> 值)	4.547, 0.000		
B VS C(<i>t</i> 值, <i>P</i> 值)	11.045, 0.000		

2.2 *Twist* mRNA 表达与淋巴结转移及 Dukes 分期的关系

所有患者中,无淋巴结转移 8 例(Dukes A/B 期),而具有淋巴结转移 12 例(Dukes C/D 期)。*Twist* mRNA 的表达水平在 Dukes C/D 期组织中的表达水平为(3.01 ± 0.51),显著高于 Dukes A/B 期的(1.29 ± 0.31),差异具有统计学意义($t=8.505, P=0.000$)。

2.3 siRNA 干扰 *Twist* 对 CT-26 细胞的增殖及侵袭功能的影响

经 CT-26 细胞转染后,3 组 *Twist* siRNA 水平,24 h 后 450 nm 的 OD 值及 5 视野的细胞计数整体比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。CT-26 细胞转染 *Twist* siRNA 后,*Twist* mRNA 水平与对照组比较显著降低($P<0.05$),见图 1A;CCK-8 法结果显示,与对照组比较,CT-26 细胞干扰 *Twist* 基因 72 h 后的增殖能力显著降低($P<0.05$),见图 1B;进一步实验结果显示,CT-26 细胞转染 *Twist* siRNA 后,transwell 小室下层细胞数量与对照组比较显著减

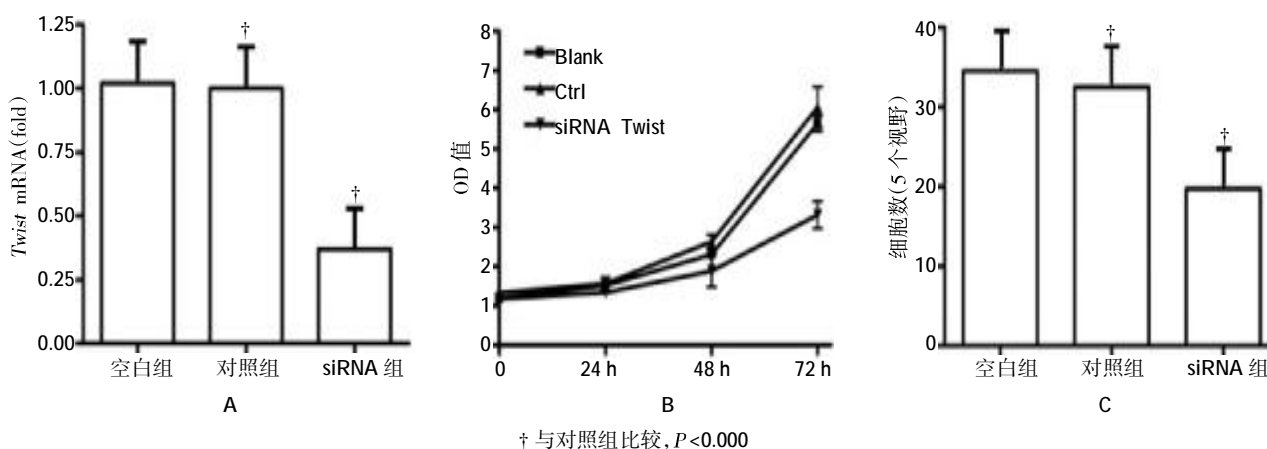


图 1 低表达 *Twist* 对结直肠癌细胞增殖及侵袭的影响

表 2 低表达 *Twist* 对结直肠癌细胞增殖及侵袭的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>Twist</i> mRNA	OD450 nm				细胞数
		0 h	24 h	48 h	72 h	
A: 空白组	1.03 ± 0.18	1.12 ± 0.06	1.41 ± 0.11	2.27 ± 0.16	5.92 ± 0.18	34.0 ± 2.6
B: 对照组	0.98 ± 0.19	1.14 ± 0.06	1.52 ± 0.17	2.52 ± 0.51	6.18 ± 0.61	32.6 ± 4.6
C: siRNA 组	0.35 ± 0.06	1.09 ± 0.05	1.20 ± 0.16	1.83 ± 0.40	3.25 ± 0.41	18.9 ± 1.8
F 值	35.556	1.213	7.136	4.848	82.439	35.556
P 值	0.000	0.325	0.007	0.024	0.000	0.000
A VS B(LSD- <i>t</i> 值, <i>P</i> 值)	0.588, 0.565	0.474, 0.642	1.269, 0.224	1.148, 0.269	1.013, 0.327	0.588, 0.565
A VS C(LSD- <i>t</i> 值, <i>P</i> 值)	7.579, 0.000	1.048, 0.311	2.448, 0.027	1.932, 0.072	10.579, 0.000	7.579, 0.000
B VS C(LSD- <i>t</i> 值, <i>P</i> 值)	6.991, 0.000	1.522, 0.149	3.716, 0.002	3.081, 0.008	11.592, 0.000	6.991, 0.000

注:整体比较为单因素方差分析,两两比较为 LSD 检验

少 ($P < 0.05$), 见图 1C。此外, 对转染 *Twist* siRNA 后的 CT26 细胞的 CCK-8 法检测结果, 进行多时间点重复测量分析发现, 各时间点间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.4 CT-26 细胞干扰 *Twist* 对 *MMP-9* 的 mRNA 和蛋白表达影响

3 组的 *MMP-9* mRNA 表达水平, 整体比较差异有统计学意义 ($F = 39.381, P = 0.000$)。与对照组比较, 干扰 *Twist* 的 CT-26 细胞能显著降低 *MMP-9* mRNA 的水平, 差异有统计学意义 ($t = 7.365, P = 0.000$), 见表 3, 图 2A; 并能显著降低 *MMP-9* 蛋白的水平, 见图 2B。

表 3 低表达 *Twist* 对 CT-26 细胞迁徙基因 *MMP-9* mRNA 及蛋白水平影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>MMP-9</i> mRNA	F 值	P 值
空白组	1.14 ± 0.22		
对照组	1.02 ± 0.20	39.381	0.000
siRNA 组	0.31 ± 0.04 [†]		

注: 整体比较为单因素方差分析, 两两比较为 LSD 检验; [†] 与对照组比较, $t = 7.365, P = 0.000$

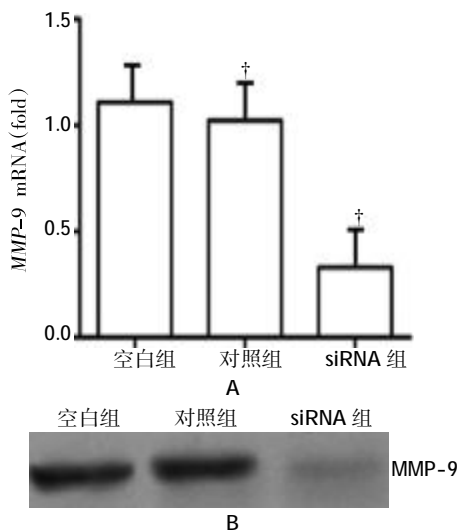


图 2 低表达 *Twist* 对 CT-26 细胞迁徙基因 *MMP-9* mRNA 及蛋白水平影响

3 讨论

结直肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 且近年来, 全世界结直肠癌的发病率和死亡率呈现逐年上升的趋势^[8]。因此, 研究结直肠癌发病的细胞学及分子学机制对其预防和治疗有着极大的临床意

义。*Twist* 是一种最早在果蝇的受精卵中被发现的基因, 由于果蝇胚胎 *Twist* 基因缺失后的发育呈一种“扭曲”的现象, 表现为原肠胚形成受阻、中胚层发育障碍而导致胚胎发育的末期死亡, 从而将该基因命名为“*Twist*”^[9]。近年来, 越来越多的研究认为 *Twist* 基因参与上皮-间质转变过程中的调控, 其在卵巢癌、胰腺癌等肿瘤细胞发生及其侵袭和转移中均发挥十分重要的功能^[10-12]。然而目前, *Twist* 在结直肠癌中的表达水平以及其对结直肠癌细胞的增殖以及侵袭能力的影响机制尚不完全明了。

本研究发现, *Twist* 在结直肠癌组织以及癌旁组织中 mRNA 水平显著高于正常黏膜组织, 且癌组织中表达更高; 此外, *Twist* 在伴有淋巴结转移的癌组织中其表达水平高于无淋巴结转移的癌组织, 说明 *Twist* 具有潜在的促进结肠癌的发病以及对结肠癌的转移有着一定的促进功能。这与 Sasaki 等人研究的在人食管鳞状细胞癌中 *Twist* 高表达, 并参与癌症转移结果一致^[9]。为了进一步观察 *Twist* 对结直肠癌细胞的增殖及迁移能力的影响, 笔者通过 siRNA 干扰技术对结直肠癌细胞系 CT-26 细胞系低表达 *Twist*。结果发现, 结直肠癌细胞 *Twist* 低表达后, 癌细胞的增殖及侵袭能力也相应降低, 提示了 *Twist* 对结肠癌的细胞增殖以及转移具有重要的促进作用。恶性肿瘤发生浸润转移重要的步骤之一是肿瘤细胞对基质的降解, 而 *MMP-9* 已被证实参与多种肿瘤的浸润转移^[13-15]。为了进一步探讨 *Twist* 影响结直肠癌细胞迁移的机制, 笔者检测了 siRNA 干扰 *Twist* 水平后的 *MMP-9* 的表达, 结果发现 *Twist* 低表达后能够显著抑制 *MMP-9* 的表达水平, 从而提示 *Twist* 可能通过促进 *MMP-9* 的表达来增加癌细胞迁移能力, 这与 Li 等在人腹膜间皮细胞中高表达 *Twist* 后可以增加细胞的迁移能力的结果一致^[16]。

综上所述, *Twist* 可能通过促进 *MMP-9* 的表达增加癌症的迁移, 其在结直肠癌的发生、发展中发挥着及其重要的作用。临床中 *Twist* 的检测对结肠癌的诊断及预后可能具有一定的指导意义。

参 考 文 献:

- [1] 赵亮, 丁彦青. 结直肠癌转移机制研究进展[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2014, 43(4): 486-493.
- [2] Qin Q, Xu Y, He T, et al. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms[J]. Cell

- Res, 2012, 22(1): 90-106.
- [3] Yang MH, Chen CL, Chau GY, et al. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1464-1474.
- [4] Zhang Z, Xie D, Li X, et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer[J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(4): 598-606.
- [5] Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, et al. Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28: 158.
- [6] Valdés-Mora F, Gómez del Pulgar T, Bandrés E, et al. TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2009, 16(1): 78-87.
- [7] Yu W, Kamara H, Svoboda KK. The role of twist during palate development[J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(10): 2716-2725.
- [8] Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2014, 383(9927): 1490-1502.
- [9] Simpson P. Maternal-Zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in drosophila embryos[J]. *Genetics*, 1983, 105(3): 615-632.
- [10] Roesch A. TWIST and switch' metastasis [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2014, 27(2): 157-158.
- [11] Wang T, Li Y, Tuerhanjiang A, et al. Correlation of Twist up-regulation and senescence bypass during the progression and metastasis of cervical cancer[J]. *Front Med*, 2014, 8(1): 106-112.
- [12] Nuti SV, Mor G, Li P, et al. TWIST and ovarian cancer stem cells: implications for chemoresistance and metastasis[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(17): 7260-7271.
- [13] Xu C, Hu DM, Zhu Q. eEF1A2 promotes cell migration, invasion and metastasis in pancreatic cancer by upregulating MMP-9 expression through Akt activation[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(7): 933-944.
- [14] Li X, Yang Z, Song W, et al. Overexpression of Bmi-1 contributes to the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by increasing the expression of matrix metalloproteinase (MMP)2, MMP-9 and vascular endothelial growth factor via the PTEN/PI3K/Akt pathway[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43: 793-802.
- [15] Hsin CH, Wu BC, Chuang CY, et al. Selaginella tamariscina extract suppresses TPA-induced invasion and metastasis through inhibition of MMP-9 in human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13: 234.
- [16] Li C, Ren Y, Jia X, et al. Twist overexpression promoted epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells under high glucose[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27: 4119-4124.

(张蕾 编辑)