

Twist、E-cadherin在胆管细胞癌中的表达及意义

李彦旭, 柴新群, 童玲, 冯贤松

■背景资料

Twist基因是一种高度保守的碱性螺旋-环-螺旋转录因子, 位于染色体7p21.2, 编码由202个氨基酸组成的蛋白质, 最初在果蝇中发现, 属于HLH蛋白超家族。Twist能通过抑制E-cadherin的表达来调节肿瘤细胞上皮-间质转化(EMT), 从而促进肿瘤浸润及转移, Twist还能通过多种途径抑制细胞凋亡, 表现出癌基因的特点, 故其在肿瘤发生、发展和转移过程中发挥重要作用。

■同行评议者

邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科; 韩天权, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科

李彦旭, 柴新群, 童玲, 冯贤松, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 此课题由李彦旭与柴新群设计; 研究过程由李彦旭、童玲及冯贤松操作完成; 数据分析与论文写作由李彦旭与柴新群完成。

通讯作者: 柴新群, 副教授, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科。

xinqunc@hotmail.com

电话: 027-85351623

收稿日期: 2009-06-11 修回日期: 2009-08-07

接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-09-18

Significance of expression of Twist and E-cadherin in cholangiocarcinoma

Yan-Xu Li, Xin-Qun Chai, Ling Tong, Xian-Song Feng

Yan-Xu Li, Xin-Qun Chai, Ling Tong, Xian-Song Feng, Department of Hepatobiliary Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Xin-Qun Chai, Department of Hepatobiliary Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. xinqunc@hotmail.com

Received: 2009-06-11 Revised: 2009-08-07

Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-09-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of the transcription factor Twist and the epithelial adhesion factor E-cadherin in cholangiocarcinoma and analyze its significance in the invasion and metastasis of cholangiocarcinoma.

METHODS: Forty-nine cholangiocarcinoma specimens, including 29 intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and 20 extrahepatic cholangiocarcinoma (ECC) specimens, were collected from patients surgically treated at our hospital from January 2008 to March 2009. Twenty-four tumor-adjacent tissue specimens and 20 normal bile duct tissue specimens were used as controls. The expression of Twist and E-cadherin was evaluated by immunohistochemistry, and its clinicopathological significance in the invasion and metastasis of cholangiocarcinoma was analyzed.

RESULTS: The expression of Twist was significantly higher in ICC and ECC than in tumor-adjacent tissue and normal bile duct tissue (79.31% and 80.0% vs 20.83% and 15.0%, respectively; all $P < 0.05$). The expression of E-cadherin was significantly lower in ICC and ECC than in tumor-adjacent tissue and normal bile duct tissue (44.83% and 40.0% vs 95.24% and 100%, respectively; all $P < 0.05$). A significant negative correlation was noted between the expression of Twist and E-cadherin in cholangiocarcinoma ($r = 0.67$, $P < 0.01$). The expression of Twist was correlated with CA19-9 level, tumor infiltration and lymph node metastasis (all $P < 0.05$), but not correlated with patients' age and sex and tumor grade ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The abnormal expression of Twist and E-cadherin was correlated with the progression of cholangiocarcinoma. Twist over-expression may be involved in the invasion and metastasis of cholangiocarcinoma.

Key Words: Twist; E-cadherin; Cholangiocarcinoma

Li YX, Chai XQ, Tong L, Feng XS. Significance of expression of Twist and E-cadherin in cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(26): 2744-2747

摘要

目的: 探讨转录因子Twist及上皮黏附分子E-cadherin在人肝内外胆管细胞癌、癌旁和正常胆管中的表达及其意义。

方法: 收集2008-01/2009-03华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科和胰腺外科中心手术切除的胆管细胞癌患者49例, 其中肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)29例, 肝外胆管细胞癌(extrahepatic cholangiocarcinoma, ECC)20例; 另取24例癌旁组织(ICC与ECC各12例)、20例正常的胆管组织作为对照。免疫组织化学法检测Twist及E-cadherin的表达, 分析其临床病理意义。

结果: Twist蛋白在ICC及ECC中表达明显强于癌旁组织或正常胆管(79.31%, 80.0% vs

20.83%, 15.0%, 均 $P<0.05$); E-cadherin在ICC及ECC中表达明显弱于癌旁组织或正常胆管组织(44.83%, 40.0% vs 95.24%, 100%, 均 $P<0.05$), 组间表达差异有显著性; Twist和E-cadherin在胆管细胞癌中表达呈高度负相关($r = 0.67$, $P<0.01$); Twist蛋白表达水平与年龄、性别及组织病理分级无关($P>0.05$), 而与CA19-9水平、肿瘤浸润及淋巴结转移有关($P<0.01$).

结论: Twist与E-cadherin的异常表达与胆管细胞癌的发生发展相关; Twist可能参与了胆管细胞癌浸润转移的过程.

关键词: Twist蛋白; E-钙黏素; 胆管细胞癌

李彦旭, 柴新群, 童玲, 冯贤松. Twist、E-cadherin在胆管细胞癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(26): 2744-2747
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2744.asp>

0 引言

近年来, 世界范围内肝内胆管细胞癌的发病率和死亡率快速上升^[1], 与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)相比其更容易发生淋巴结转移及术后复发^[2], 但其发生、发展和浸润转移机制尚不清楚. 近期研究表明, Twist能通过抑制E-cadherin的表达来调节肿瘤细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 从而促进肿瘤浸润及转移^[3-5], Twist还能通过多种途径抑制细胞凋亡^[6], 表现出癌基因的特点, 故其在肿瘤发生、发展和转移过程中发挥重要作用; 另有研究发现, 作为转录因子的Twist基因在HCC、胰腺癌、乳腺癌和卵巢癌等恶性肿瘤中均有异常表达^[7-10], 但Twist基因在胆管细胞癌中的表达却未见报道. 本文主要探讨Twist基因在人肝内外胆管细胞癌、癌旁及正常胆管组织中的表达及临床意义, 并分析Twist表达与E-cadherin的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2008-01/2009-03我院肝胆外科和胰腺外科中心手术切除的胆管细胞癌患者49例, 各取癌组织, 其中男24例, 女25例, 年龄36-82(平均年龄59)岁, 患者均经病理学证实. 所有患者中肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)29例, 肝外胆管癌(extrahepatic cholangiocarcinoma, ECC)20例; 病理类型高分化腺癌16例, 中分化腺癌13例, 低分

表 1 Twist及E-cadherin蛋白在各组织中的表达

组织类型	n	阳性 n(%)	
		Twist	E-cadherin
ICC	29	23(79.31)	13(44.83)
ECC	20	16(80.00)	8(40.00)
ICC+ECC	49	39(79.59) ^b	21(42.86) ^b
癌旁组织	24	5(20.83)	23(95.24)
正常胆管组织	20	3(15.00)	20(100.00)

^b $P<0.01$ vs 癌旁及正常胆管组织, ICC与ECC组差异无显著性, 统一为肿瘤组, E-cadherin阳性组并未包括弱阳性例.

化腺癌20例; 存在周围浸润29例, 有淋巴结转移20例(40.8%); 27例CA19-9升高, 其中20例大于300 kU/L; 另取24例癌旁组织(ICC与ECC各12例)、20例正常的胆管组织作为对照(取自肝血管瘤标本). 标本经40 g/L甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片. SC-15393 Twist(H-81)兔多克隆一抗购自美国Santa Cruz生物技术公司; MAB-0589 E-cadherin(A42C7)鼠单克隆一抗及SP试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术公司.

1.2 方法 应用SP法对Twist、E-cadherin进行免疫组织化学染色, 具体步骤严格按说明书进行, 兔抗人Twist一抗工作浓度为1:200, 0.01 mol/L PBS代替一抗作阴性对照. 判断标准: Twist阳性染色主要定位于胞质中, E-cadherin阳性染色主要定位于细胞膜. 以细胞呈清晰棕色或棕褐色为阳性, 免疫组织化学结果分级方法: 无或淡黄色着色为阴性(-), 黄色颗粒为弱阳性(+), 棕黄色颗粒状为中度阳性(++), 深棕黄色为强阳性(+++).

统计学处理 采用SPSS12.0软件分析结果, 两个样本率间采用卡方检验、校正检验、Fisher确切概率法及级联相关处理结果. $P<0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 Twist的表达 切片中Twist蛋白定位处显色为棕黄或棕褐色, 主要位于细胞质中, 少数于细胞核表达. 阳性表达普遍见于胆管细胞癌组织中(约79.6%), 其中29例呈(++)-(+++)-表达. 实验中发现癌细胞分化越低, 浸润性越强, 则阳性细胞越多, 无浸润性的癌组织Twist表达较弱. 大多数癌旁组织和正常胆管组织无Twist表达, 少数呈弱阳性表达. Twist蛋白在ICC、ECC、癌旁组织及正常胆管组织的阳性率分别是79.31%、80.0%、20.83%和15.0%, 在ICC及ECC中表达明显强于

■ 研发前沿

在胆管细胞癌发生发展过程中, 许多分子机制参与作用, 但分子生物学研究并未能完全解释其发生发展浸润转移的过程, 故立足于每种细胞因子的体内或体外研究, 仍有助于去揭示这些细胞因子在胆管细胞癌发生发展中的作用, 并为今后临床上胆管细胞癌靶向治疗提供新的思路.

■ 相关报道

国内外对Twist的作用研究多集中在乳腺癌及泌尿系统肿瘤, 而对其在胆管细胞癌中的表达及作用机制则少见文献报道.

■应用要点

本研究提示胆管细胞癌中Twist表达增高, 而E-cadherin表达减少, 可能参与了肿瘤细胞的上皮间质转化, 肿瘤细胞间黏附作用降低, 导致肿瘤细胞的浸润和转移, 并且两者表达呈负相关, 表明两者存在调节机制, 转录因子Twist和黏附分子E-cadherin与胆管细胞癌的浸润转移相关, 可能为今后胆管细胞癌的治疗提供了一个新的靶点。

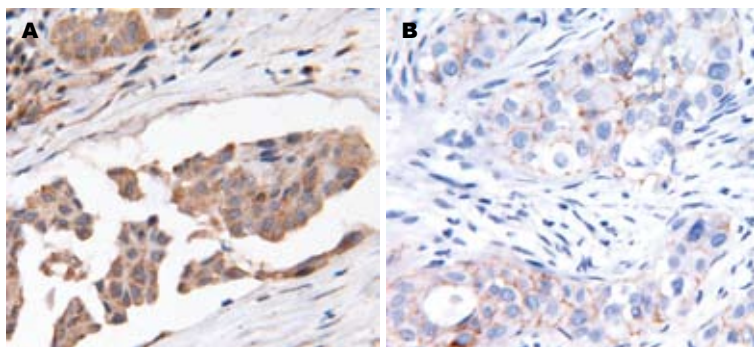


图1 Twist和E-cadherin在肿瘤组织中的表达(SP × 400). A: Twist; B: E-cadherin.

表2 胆管细胞癌中Twist与E-cadherin表达的关系 (n)

Twist	E-cadherin				合计
	-	+	++	+++	
-	0	0	4	6	10
+	0	2	6	2	10
++	4	6	3	0	13
+++	6	10	0	0	16
合计	10	18	13	8	49

癌旁组织或正常胆管组织($P < 0.01$); 而在ICC和ECC中的表达无显著性差异($P > 0.05$, 表1, 图1).

2.2 E-cadherin的表达 E-cadherin阳性染色为棕黄色或棕褐色, 主要定位于细胞膜. 在ICC、ECC、癌旁组织及正常胆管组织的阳性率分别是44.83%、40.0%、95.24%和100%, 在ICC及ECC中表达弱于癌旁组织或正常胆管组织, 组间表达有统计学意义(表1, 图1).

2.3 Twist和E-cadherin在胆管癌中表达的相关性 Twist和E-cadherin表达在胆管细胞癌中呈明显负相关($r = 0.67$, $P < 0.01$, 表2).

2.4 Twist蛋白表达与胆管细胞癌临床生物学行为的关系 Twist蛋白表达水平与年龄、性别及组织病理分级无关($P > 0.05$), 与CA19-9水平、肿瘤浸润及淋巴结转移有关($P < 0.01$, 表3).

3 讨论

Twist基因是一种高度保守的碱性螺旋-环-螺旋转录因子, 位于染色体7p21.2, 编码由202个氨基酸组成的蛋白质, 最初在果蝇中发现, 属于HLH蛋白超家族. 在启动区, bHLH蛋白二聚体及该家族的其他成员与短保守序列相结合, 称为E-盒子, 从而转录调节目基因, 参与机体的多种调节过程. Twist广泛表达于中胚层起源的组织细胞, 参与中胚层发育及形态形成运动. 在诱导细胞移动及组织塑形中起重要作用. 最早由Yang *et al*在2004报道了其在乳腺癌中的表达, 随后

表3 Twist蛋白表达与胆管细胞癌临床病理因素的关系

分组	n	Twist表达 n(%)
性别		
男	25	22(88.00)
女	24	17(70.83)
年龄(岁)		
<60	26	18(69.23)
>60	23	21(91.30)
分化程度		
高	16	11(68.75)
中	13	11(84.62)
低	20	17(85.00)
CA19-9(kU/L)		
<300	29	5(17.24) ^a
>300	20	10(50.00)
浸润		
无	20	7(35.00) ^b
有	29	24(82.76)
淋巴结转移		
无	29	6(20.69) ^b
有	20	18(90.00)

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs CA19-9>300 kU/L, 有浸润与淋巴结转移.

相继报道在肝细胞癌、胰腺癌和卵巢癌中也表达^[7-10]. 目前已在多种人类上皮来源肿瘤中发现Twist表达增高, 而在胆管细胞癌中表达还未见报道. E-钙黏蛋白是一种在上皮细胞黏附中必不可少的肿瘤抑制基因跨膜糖蛋白, 他属于细胞黏附分子蛋白质家族, 该家族蛋白广泛表达于各种组织中. 钙黏素通过胞外域与其他钙黏素的相互作用调解细胞与细胞间的黏附, 从而推动EMT, 丢失或抑制E-钙黏蛋白表达是上皮表型丢失和扩散程序启动的一个关键的事件信号. 其介导的细胞间接触可以抑制细胞增殖和肿瘤的发生, 正常细胞在彼此相接触时会停止生长, 这一过程被称为接触抑制. 细胞间接触的丧失导致相邻细胞间无需辨认进而分离, 这种接触抑制的作用也随之消失. 在肿瘤发生时, 接触抑

制失去作用, 导致失控的细胞生长, 而转录因子对E-钙黏蛋白的调控作用非常重要^[11-13].

有研究表明, Twist在膀胱癌组织标本中的表达明显高于非癌标本, 并与肿瘤的进展相关, 并且转移部位的表达高于原发部位, 同时还伴有胞膜上E-cadherin的表达减弱^[14], Kwok *et al*^[15]通过对非雄激素依赖性前列腺癌的研究发现, 通过siRNA使Twist失活后, 可以提高紫杉醇类抗癌药物的作用, 还发现肿瘤浸润和转移的能力下降. Yang *et al*首次发现Twist在乳腺癌转移中的重要作用, 通过抑制Twist的表达后, 可以有效抑制高转移能力的乳腺癌细胞如浸润性小叶癌, 高度浸润型乳腺癌发生肺转移, Twist的异常表达导致了E-cadherin介导的细胞间粘连的丧失, 并激活了一些间质分子的生成, 提示Twist在EMT中的作用^[7].

我们研究证实, Twist在ICC、ECC、癌旁组织和正常胆管组织中的阳性表达率分别为: 79.31%、80.0%、20.83%和15.0%, 其在ICC及ECC中表达明显强于癌旁组织或正常胆管组织; E-cadherin在ICC、ECC、癌旁组织和正常胆管组织中的阳性表达率分别为: 44.83%、40.0%、95.24%和100%, 在ICC及ECC中表达弱于癌旁组织或正常胆管组织; 其相关性研究表明, 二者在胆管细胞癌中表达高度相关, 两者的表达呈明显的负相关, 提示一方面胆管细胞癌组织中Twist高表达; 另一方面Twist高表达的组织伴有E-cadherin的表达减弱或消失, 二者之间可能存在抑制表达的机制, 这与相关文献的报道结果相一致. 另外, 我们的实验还发现Twist蛋白表达水平与年龄、性别及组织病理分级无关 ($P>0.05$), 与CA19-9水平、肿瘤浸润及淋巴结转移有关, 可能提示其Twist表达可能与肿瘤浸润及淋巴结转移相关.

总之, Twist的高表达与E-cadherin的低表达与胆管细胞癌的发生发展相关; Twist可能参与了胆管细胞癌浸润转移的过程. 进一步的研究需要证实Twist与E-cadherin的影响关系以其作用机制, Twist与其他相关基因的关系, 以及是否存在可以抑制Twist表达的方法. 随着基础研究的不断深入, 以Twist为靶点的治疗或可成为胆管细胞癌的重要治疗手段之一.

4 参考文献

- 1 Hammill CW, Wong LL. Intrahepatic cholangiocarcinoma: a malignancy of increasing importance. *J Am Coll Surg* 2008; 207: 594-603
- 2 Yang J, Yan LN. Current status of intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14:

- 6289-6297
- 3 Karreth F, Tuveson DA. Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 1058-1059
- 4 Lopez D, Niu G, Huber P, Carter WB. Tumor-induced upregulation of Twist, Snail, and Slug represses the activity of the human VE-cadherin promoter. *Arch Biochem Biophys* 2009; 482: 77-82
- 5 Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, Abbruzzese JL, Hortobagyi GN, Hung MC. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res* 2007; 67: 9066-9076
- 6 Zhang X, Wang Q, Ling MT, Wong YC, Leung SC, Wang X. Anti-apoptotic role of TWIST and its association with Akt pathway in mediating taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 2007; 120: 1891-1898
- 7 Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, Kwok WK, Wang XH, Wong YC, Guan XY, Man K, Chau KL, Fan ST. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5369-5376
- 8 Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; 117: 927-939
- 9 Kajiyama H, Hosono S, Terauchi M, Shibata K, Ino K, Yamamoto E, Nomura S, Nawa A, Kikkawa F. Twist expression predicts poor clinical outcome of patients with clear cell carcinoma of the ovary. *Oncology* 2006; 71: 394-401
- 10 Satoh K, Hamada S, Kimura K, Kanno A, Hirota M, Umino J, Fujibuchi W, Masamune A, Tanaka N, Miura K, Egawa S, Motoi F, Unno M, Vonderhaar BK, Shimosegawa T. Up-regulation of MSX2 enhances the malignant phenotype and is associated with twist 1 expression in human pancreatic cancer cells. *Am J Pathol* 2008; 172: 926-939
- 11 Pirone DM, Liu WF, Ruiz SA, Gao L, Raghavan S, Lemmon CA, Romer LH, Chen CS. An inhibitory role for FAK in regulating proliferation: a link between limited adhesion and RhoA-ROCK signaling. *J Cell Biol* 2006; 174: 277-288
- 12 Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 2008; 68: 3645-3654
- 13 Gort EH, Suijkerbuijk KP, Roothaan SM, Raman V, Vooijs M, van der Wall E, van Diest PJ. Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3325-3330
- 14 Zhang Z, Xie D, Li X, Wong YC, Xin D, Guan XY, Chua CW, Leung SC, Na Y, Wang X. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum Pathol* 2007; 38: 598-606
- 15 Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TC, Zhou C, Zhang X, Chua CW, Chan KW, Chan FL, Glackin C, Wong YC, Wang X. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res* 2005; 65: 5153-5162

■同行评价

本研究总体设计科学, 结果、结论可靠, 具有重要的意义.