

Twist1, MMP-2和MMP-9在结直肠癌组织中的表达及意义

杨振忠, 吴正升, 法文, 李守新, 吕永芳

■背景资料

目前研究显示, 明胶酶(MMP-2和MMP-9)及其抑制因子(TIMP-1和TIMP-2)在结直肠癌侵袭转移过程中发挥了重要作用。探讨结直肠癌明胶酶上游调控因子对认识肿瘤侵袭转移过程有着重要意义。

杨振忠, 法文, 李守新, 吕永芳, 新华医疗集团新华医院病理科 安徽省淮南市 232007

吴正升, 安徽医科大学病理学教研室 安徽省合肥市 230032
作者贡献分布: 杨振忠与吴正升对此文所作贡献均等; 此课题由杨振忠与吴正升共同设计; 研究过程由杨振忠、法文、李守新及吕永芳共同完成; 研究使用新试剂及分析工具由吴正升提供; 论文写作由杨振忠与吴正升完成。

通讯作者: 吴正升, 副教授, 230032, 安徽省合肥市, 安徽医科大学病理学教研室: woozson@126.com

电话: 0551-5161130 传真: 0551-5161130

收稿日期: 2010-11-03 修回日期: 2010-12-10

接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-01-28

Expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 in colorectal cancer

Zhen-Zhong Yang, Zheng-Sheng Wu, Wen Fa, Shou-Xin Li, Yong-Fang Lv

Zhen-Zhong Yang, Wen Fa, Shou-Xin Li, Yong-Fang Lv, Department of Pathology, Xinhua Hospital, Huainan Xinhua Medical Group, Huainan 232052, Anhui Province, China
Zheng-Sheng Wu, Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China
Correspondence to: Associate Professor Zheng-Sheng Wu, Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China. woozson@126.com
Received: 2010-11-03 Revised: 2010-12-10
Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-01-28

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of the expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 proteins in colorectal cancer.

METHODS: The expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 proteins was examined on tissue chips containing 92 colorectal cancer samples by immunohistochemistry.

RESULTS: The positive rates of Twist1, MMP-2 and MMP-9 protein expression in colorectal cancer were 64.1%, 66.3% and 67.4%, respectively. High expression of Twist1 was positively correlated with lymph node metastasis and TNM stage (both $P < 0.05$) but inversely with patient's overall survival and relapse-free survival ($P < 0.05$ and 0.01 , respectively). The expression of MMP-2 and MMP-9 was significantly correlated with lymph node metastasis (both $P < 0.01$). A

positive correlation was also found between MMP-9 expression and tumor size ($P < 0.01$). The expression of Twist1 was positively correlated with that of MMP-9 ($P < 0.05$), but not with that of MMP-2 ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 plays an important role in tumor invasion and metastasis in colorectal cancer. The expression of MMP-9 might be partly regulated by Twist1.

Key Words: Colorectal cancer; Twist1; MMP-2; MMP-9; Immunohistochemistry

Yang ZZ, Wu ZS, Fa W, Li SX, Lv YF. Expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 314-317

摘要

目的: 研究Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白在结直肠癌组织中的表达及其相互关系。

方法: 建立组织微阵列平台, 应用免疫组织化学方法检测92例结直肠癌组织Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白的表达情况。

结果: 结直肠癌中Twist1的表达率为64.1%, MMP-2和MMP-9阳性率分别为66.3%和67.4%; Twist1的表达与肿瘤淋巴结受累和TNM分期均呈正相关(均 $P < 0.05$), 并且与患者总生存率和无复发生存率呈负相关($P < 0.01$, $P < 0.05$); MMP-2、MMP-9蛋白表达与肿瘤淋巴结受累均呈显著正相关(均 $P < 0.01$), 并且MMP-9蛋白表达与肿瘤大小也呈显著正相关($P < 0.01$); Twist1表达状况与MMP-9的表达呈显著正相关($r = 0.205$, $P < 0.05$), 而与MMP-2表达无显著相关性。

结论: 结直肠癌Twist1、MMP-2和MMP-9表达状况与肿瘤侵袭转移有密切关系; MMP-9表达可能在一定水平上受到Twist1调控。

关键词: 结直肠癌; Twist1; MMP-2; MMP-9; 免疫组织化学

杨振忠, 吴正升, 法文, 李守新, 吕永芳. Twist1, MMP-2和

■同行评议者

纪小龙, 教授, 武警总医院纳米医学研究所

MMP-9在结直肠癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 314-317

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/314.asp>

0 引言

结直肠癌是临床最常见的恶性肿瘤之一, 癌细胞的侵袭转移是其难以根治和导致患者死亡的主要原因. 目前研究显示: 明胶酶(MMP-2和MMP-9)及其抑制因子(TIMP-1和TIMP-2)在结直肠癌侵袭转移过程中发挥了重要作用^[1-4]. 探索结直肠癌明胶酶上游调控因子对认识肿瘤侵袭转移过程有着重要意义. 近期研究显示, Twist1基因具有癌基因的特性, 能够通过多种途径控制肿瘤细胞凋亡, 血管生成和侵袭转移, 在恶性肿瘤发生和发展过程中发挥了重要作用^[5,6]. 本研究在结直肠癌组织微阵列平台上, 通过免疫组织化学技术检测Twist1基因表达, 分析Twist1表达强度与肿瘤临床病理特征和患者预后的相关性, 并进一步探讨其与明胶酶表达的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 收集淮南市新华医疗集团新华医院病理科结直肠癌患者92例, 年龄27-78(中位年龄50.0)岁, 术前均未接受过化疗、免疫或放射等抗肿瘤治疗. 按WHO最新标准对各病例进行病理学分级和分型, 其中高分化腺癌8例, 中分化腺癌44例, 低分化腺癌40例. Duke's分期: A和B期37例、C和D期55例. 所有组织均以40 g/L甲醛液固定, 石蜡包埋. 兔抗人Twist1多克隆抗体购自Santa Cruz公司, 鼠抗人MMP-2和MMP-9单克隆抗体、通用型SP法免疫组织化学试剂盒及DAB显色剂均购自福州迈新公司.

1.2 方法

1.2.1 组织芯片制备: 复查每例HE染色切片, 选取代表性组织位点, 使用定位器在切片上进行标记, 每例样本选3个位点; 使用组织芯片制备仪(HT-1, 辽宁恒泰公司), 采用取样针内径为1 mm, 通过打孔、定位、取样、点样和二次包埋制成直径1 mm, 间距1 mm的组织芯片蜡块; 以3 μ m厚度连续切片, 敷贴于10%多聚赖氨酸预先处理的载玻片上, 待用.

1.2.2 免疫组织化学法检测Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白在结直肠癌组织中的表达: 具体操作按试剂盒说明书染色步骤进行. 以PBS缓冲液代替一抗作阴性对照, 用已知阳性标本作为阳性对照.

1.2.3 结果判定: Twist1染色以细胞质出现明显的

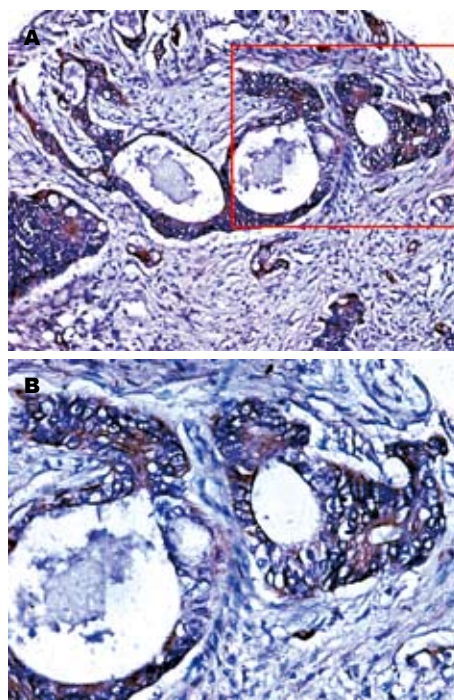


图1 Twist1在结直肠癌组织中的表达(免疫组织化学染色). A: 结直肠癌细胞高表达Twist1($\times 100$); B: 结直肠癌Twist1阳性表达主要定位于细胞质(图1A方框, $\times 200$).

黄色或棕黄色颗粒视为阳性着色, 参照Kyo等^[7]提出的染色标准综合阳性细胞率及染色强度进行评估, 判断表达强度: 两者积分之和 <6 为弱表达, ≥ 6 为高表达. MMP-2和MMP-9以细胞膜或胞质出现明显的黄色或棕黄色颗粒视为阳性着色, 按Shimizu等^[8]评分标准进行半定量分析, 根据镜下观察阳性细胞比例及阳性着色强度. 阳性细胞数按无着色、阳性细胞数 $<1/3$ 、 $1/3-2/3$ 和 $>2/3$ 分别判为0、1、2、3分, 每张切片阳性细胞的着色强度按无着色、黄色、棕黄色和棕褐色分别判为0、1、2、3分, 根据两项积分之和判断其结果, ≥ 3 分为阳性.

统计学处理 采用SPSS10.0 for Window软件进行统计学处理. 采用 χ^2 检验, 非参数Spearman等级相关检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白在结直肠癌中表达和分布 Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白阳性信号呈黄色或棕黄色颗粒状, 主要定位于细胞胞质(图1). 92例结直肠癌组织中, Twist1高表达率为64.1%, MMP-2和MMP-9阳性率分别为66.3%和67.4%. 阳性肿瘤细胞分布呈异质性, 表现为片状、灶状或散在分布.

2.2 Twist1蛋白表达与结直肠癌临床病理特征以及患者预后的关系 结直肠癌Twist1的表达与肿

■ 相关报道

Lee等研究发现MMP-2和MMP-9直接参与了TGF β 1和Twist1介导的乳腺细胞EMT过程; Okamura等将Twist1基因稳定转染到恶性骨肉瘤细胞中, 发现肿瘤细胞TIMP-1基因表达显著下调; 因而可以推测Twist1基因可能间接促进MMP-9表达.

■ 创新盘点

本研究在结直肠癌组织微阵列平台上, 通过免疫组织化学技术检测Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白的表达, 结果表明Twist1、MMP-2和MMP-9表达状况与结直肠癌侵袭转移有密切关系; MMP-9表达可能在一定水平上受到Twist1调控. Twist1基因在结直肠癌侵袭转移过程中可能发挥了重要作用.

■应用要点

Twist1基因在结直肠癌侵袭转移过程中可能发挥了重要作用,是一个辅助判断结直肠癌患者预后的有效生物标志物,并且Twist1和MMP-9在结直肠癌演进过程中关系密切;两者之间具体调控机制有待进一步研究。

表1 结直肠癌组织Twist1蛋白表达与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	n	Twist1高表达n(%)	P值
年龄(岁)			
≤55	38	25(65.8)	0.781
>55	54	34(63.0)	
肿瘤大小(cm)			
≤5	54	34(63.0)	0.781
>5	38	25(65.8)	
淋巴结转移			
无	35	12(34.3)	0.001
有	57	47(82.5)	
组织学分级			
I	8	4(50.0)	0.301
II	44	26(59.1)	
III	40	29(72.5)	
Duke's分期			
A+B	37	15(40.5)	0.001
C+D	55	44(80.0)	

瘤淋巴结转移和Duke's分期均呈正相关($P<0.01$, $P<0.05$),而与患者年龄、肿块大小、组织学分级均无统计学意义(均 $P>0.05$); Twist1的表达与结直肠癌患者总生存率和无复发生存率均呈负相关($P<0.01$, $P<0.05$, 表1, 图2)。

2.3 MMP-2和MMP-9蛋白表达与结直肠癌临床病理特征的关系 结直肠癌MMP-2和MMP-9的表达与肿瘤淋巴结转移和TNM分期均呈正相关(均 $P<0.01$),且MMP-9的表达与肿瘤大小呈正相关($P<0.01$),而与患者年龄和组织学分级均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

2.4 结直肠癌组织中Twist1表达与MMP-2、MMP-9表达的相关性 Spearman相关性分析显示: Twist1和MMP-9的表达均呈显著正相关($r=0.205$, $P<0.05$),而与MMP-2表达无显著相关性($P>0.05$)。

3 讨论

Twist1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,在胚胎生长发育阶段诱导细胞迁移的调控过程中发挥重要作用,最早在果蝇中被发现,广泛表达于中胚层起源的组织和细胞,在出生后降至低水平。最近研究发现, Twist1具有癌基因的特征,能够抑制肿瘤细胞凋亡,参与肿瘤细胞周期的调控,并通过调解肿瘤细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等参与了恶性肿瘤的发生,并且促进肿瘤侵袭转移。Yang等^[9]研究发现Twist1高表达的乳腺癌细胞易发生转移,而Twist1低表达的

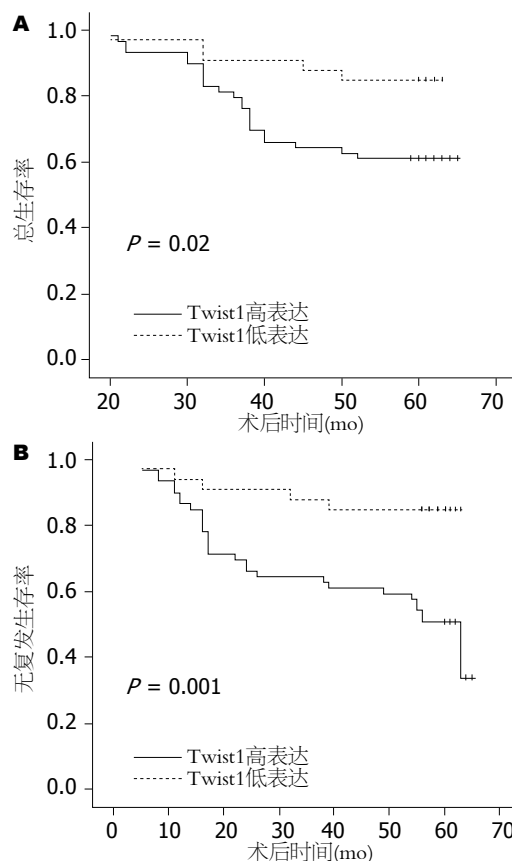


图2 结直肠癌Twist1表达与患者预后的相关性分析。

乳腺癌细胞没有或极少发生转移。Kyo等^[7]检测了70例子宫内膜癌的Twist1表达,发现51%病例呈Twist1高表达,并且Twist1表达状况与肿瘤局部侵袭和患者生存期呈显著正相关,是一个独立的预后因子。Valdés-Mora等^[10]使用实时定量PCR技术检测了54例结直肠癌及其癌旁正常黏膜Twist1的mRNA表达,发现结直肠癌Twist1 mRNA表达显著高于正常黏膜组织表达,并且其表达还与肿瘤淋巴结转移呈显著正相关。本研究在92例结直肠癌中检测了Twist1蛋白的表达,发现64.1%的结直肠癌为高表达,且Twist1的表达与肿瘤淋巴结受累和TNM分期均呈正相关,并且与患者总生存率和无复发生存率均呈负相关,结果与文献报道相似,提示Twist1是结直肠癌演进过程中一个重要因子,对肿瘤侵袭转移有着重要促进作用,是一个辅助判断结直肠癌进展和患者预后的标志物。鉴于Twist1在肿瘤发生发展中的重要角色,我们进一步探讨了Twist1发挥作用可能的下游靶基因。

明胶酶(MMP-2和MMP-9),是基质金属蛋白酶家族重要成员,能够特异性降解基底膜和细胞外基质的大多数蛋白质,在肿瘤侵袭、转移中起着极为重要的作用,这一点已在对多种

肿瘤组织的侵袭行为、转移潜能与明胶酶表达水平的相关分析的研究中得到证实^[11]. 在本课题组既往研究中, 我们也发现肿瘤组织MMP-2和MMP-9的表达与肿瘤淋巴结转移、临床分期以及患者预后均有密切关系^[12,13]. 本研究同时检测了MMP-2和MMP-9在结直肠癌组织中表达, 结果显示MMP-2、MMP-9与结直肠癌的肿块大小和转移有显著相关性.

进一步, 我们将结直肠癌Twist1表达分别与MMP-2和MMP-9进行相关性分析, 结果显示Twist1表达状况与MMP-9的表达呈显著正相关, 而与MMP-2表达无显著相关性. Lee等研究发现MMP-2和MMP-9直接参与了TGF β 1和Twist1介导的乳腺细胞EMT过程^[14]; Okamura等^[15]将Twist1基因稳定转染到恶性骨肉瘤细胞中, 发现肿瘤细胞TIMP-1基因表达显著下调, 而TIMP-1是MMP-9的天然抑制物, 因而可以推测Twist1基因可能间接促进MMP-9表达. 本研究结果结合文献报道表明, Twist1基因和明胶酶中MMP-9在结直肠癌中关系密切, Twist1可能在一定水平上调控MMP-9的表达.

总之, Twist1基因在结直肠癌侵袭转移过程中可能发挥了重要作用, 是一个辅助判断结直肠癌患者预后的有效生物标志物, 并且Twist1和MMP-9在结直肠癌演进过程中关系密切; 两者之间具体调控机制有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Lai KC, Huang AC, Hsu SC, Kuo CL, Yang JS, Wu SH, Chung JG. Benzyl isothiocyanate (BITC) inhibits migration and invasion of human colon cancer HT29 cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 and urokinase plasminogen (uPA) through PKC and MAPK signaling pathway. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 2935-2942
- 2 Buhmeida A, Bendardaf R, Hilska M, Collan Y, Laato M, Syrjänen S, Syrjänen K, Pyrhönen S. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in stage II colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer* 2009; 40: 91-97
- 3 Sundov Z, Tomić S, Viločić K, Kunac N, Kalebić M, Bezić J. Immunohistochemically detected high expression of matrix metalloproteinase-2 as predictor of poor prognosis in Duke's B colon cancer. *Croat Med J* 2008; 49: 636-642
- 4 Zuzga DS, Gibbons AV, Li P, Lubbe WJ, Chervoneva I, Pitari GM. Overexpression of matrix metalloproteinase 9 in tumor epithelial cells correlates with colorectal cancer metastasis. *Clin Transl Sci* 2008; 1: 136-141
- 5 Martin A, Cano A. Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 924-925
- 6 Browne G, Sayan AE, Tulchinsky E. ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer. *Cell Cycle* 2010; 9: 886-891
- 7 Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, Mizumoto Y, Maida Y, Hashimoto M, Nakamura M, Takakura M, Nakajima M, Masutomi K, Inoue M. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Hum Pathol* 2006; 37: 431-438
- 8 Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. *Hum Pathol* 1990; 21: 607-612
- 9 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
- 10 Valdés-Mora F, Gómez del Pulgar T, Bandrés E, Cejas P, Ramírez de Molina A, Pérez-Palacios R, Gallego-Ortega D, García-Cabezas MA, Casado E, Larrauri J, Nistal M, González-Barón M, García-Foncillas J, Lacal JC. TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 78-87
- 11 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43 Suppl: S42-S51
- 12 Wu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD, Yang F, Xu XC. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer* 2008; 122: 2050-2056
- 13 薛松, 李守新, 吴正升, 王晓楠, 吴强, 杨枫. CD147、基质金属蛋白酶和转化生长因子 β 1在乳腺癌中的表达与肿瘤转移和预后及其相互间关系. *中华病理学杂志* 2009; 38: 524-528
- 14 Lee YH, Albig AR, Regner M, Schiemann BJ, Schiemann WP. Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF-beta in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2243-2251
- 15 Okamura H, Yoshida K, Haneji T. Negative regulation of TIMP1 is mediated by transcription factor TWIST1. *Int J Oncol* 2009; 35: 181-186

■同行评价

本文可读性较好, 有一定的临床指导意义.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才