

结直肠癌组织中 Twist 蛋白的表达及意义

张伟杰 陈小伍 朱达坚 欧阳满照 钟强 刘长春

【摘要】 目的 探讨结直肠癌组织中 Twist 蛋白的表达及其与结直肠癌患者临床病理因素和预后的关系。**方法** 回顾性分析 2005 年 6–9 月南方医科大学附属顺德第一人民医院收治的 45 例结直肠癌患者的临床病理资料。收集患者行手术切除的结直肠组织标本进行研究。采用免疫组织化学染色检测 45 例结直肠癌组织及癌旁组织中 Twist 蛋白的表达情况,分析其与结直肠癌患者临床病理因素及预后之间的关系。采用门诊和电话方式进行随访,随访时间截至 2013 年 9 月。计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,采用 Log-rank 检验进行生存分析。预后因素分析采用 COX 单因素和多因素分析。**结果** Twist 蛋白的表达主要位于细胞质。结直肠癌组织及癌旁组织中 Twist 蛋白的阳性表达率分别为 62.2% (28/45) 和 20.0% (9/45),两者比较,差异有统计学意义 ($\chi^2=18.383, P<0.05$)。TNM 分期为 I ~ II 期结直肠癌患者 Twist 蛋白阳性表达率为 42.1%, III ~ IV 期患者为 76.9%。N0 期结直肠癌患者 Twist 蛋白阳性表达率为 41.7%, N1 ~ 2 期为 85.7%。不同 TNM 分期和淋巴结转移的患者结直肠癌组织中 Twist 蛋白的表达比较,差异均有统计学意义 ($\chi^2=5.662, 9.244, P<0.05$)。45 例患者均获得术后随访,随访时间为 10 ~ 96 个月,中位随访时间为 54 个月。Twist 蛋白表达阳性和阴性的结直肠癌患者中位生存时间分别为 44 个月和 69 个月,5 年累积生存率分别为 10.7% 和 82.4%,两者生存情况比较,差异有统计学意义 ($\chi^2=26.147, P<0.05$)。单因素分析结果显示:Twist 蛋白表达是影响结直肠癌患者预后的相关因素 ($HR=8.669, 95\%$ 可信区间:2.959 ~ 25.390, $P<0.05$)。多因素分析结果显示:Twist 蛋白表达阳性是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素 ($HR=5.059, 95\%$ 可信区间:2.888 ~ 8.863, $P<0.05$)。**结论** Twist 蛋白在结直肠癌组织中表达升高,这与结直肠癌的发生、发展密切相关。Twist 蛋白表达阳性是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素。

【关键词】 结直肠肿瘤; Twist 蛋白; 预后

Expression and significance of Twist protein in colorectal cancer Zhang Weijie, Chen Xiaowu, Zhu Dajian, Ouyang Manzhao, Zhong Qiang, Liu Changchun. Department of General Surgery, the First People's Hospital of Shunde Affiliated to Southern Medical University, Shunde 528300, China
Corresponding author: Chen Xiaowu, Email: drchenxiaowu@163.com

【Abstract】 Objective To explore the expression of Twist protein in the colorectal cancer (CRC) and its relationship between clinicopathological factors and prognosis of patients. **Methods** The clinical data of 45 patients with colorectal cancer who were admitted to the First People's Hospital of Shunde from June 2005 to September 2005 were retrospectively analyzed. The colorectal tissue specimens from surgical resection were collected. The expressions of Twist protein in the cancer and paracarcinoma tissues were examined by the immunohistochemistry, and their relationship with clinicopathological factors and prognosis of patients was analyzed. Patients were followed up by outpatient examination and telephone interview until September 2013. The count data were analyzed using the chi-square test and Fisher exact probability. The survival curve was generated using the Kaplan-Meier method, and the survival analysis was conducted using the Log-rank test. The prognosis factors were analyzed by the COX univariate analysis and multivariate analysis. **Results** The expression of Twist protein in CRC was predominantly detected in the cytoplasm of the tumor cells. The positive expression rates of Twist protein in the CRC and paracarcinoma tissues were 62.2% (28/45) and 20.0% (9/45), respectively, with a significant difference ($\chi^2=18.383, P<0.05$). The positive expression rates of Twist protein were 42.1% in patients with I–II stage of CRC and 76.9% in patients with III–IV stage of CRC. The positive expression rates of Twist protein were 41.7% in patients with N0 stage of CRC and 85.7% in patients with N1–N2 stage of CRC. The expression of Twist protein in patients with CRC was however associated with the TNM stage and lymph node metastasis ($\chi^2=5.662, 9.244, P<0.05$). A total of 45 patients were followed up for 10–96 months (median, 54 months). The median

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2015.05.013

基金项目:广东省自然科学基金(S2011010005306);佛山市科技局立项(201108191)

作者单位:528300 广东顺德,南方医科大学附属顺德第一人民医院普通外科

通信作者:陈小伍, Email: drchenxiaowu@163.com

survival time and 5-year cumulative survival rate in 45 patients with positive expression of Twist protein were 44 months and 10.7%, which were compared with 69 months and 82.4% in 45 patients with negative expression of Twist protein, with a statistical significance in the survival ($\chi^2=26.147$, $P<0.05$). The results of univariate analysis showed that the expression of Twist protein was an related factor affecting the prognosis of patients [$HR=8.669$, 95% confidence interval (CI): 2.959–25.390, $P<0.05$]. The results of multivariate analysis showed that the positive expression of Twist protein was an independent risk factor affecting the prognosis of patients ($HR=5.059$, 95% CI: 2.888–8.863, $P<0.05$). **Conclusions** The increasing expression of Twist protein in the CRC is positively correlated with the occurrence and development of CRC. The positive expression of Twist protein is an independent risk factor affecting the prognosis of patients with CRC.

【Key words】 Colorectal neoplasms; Twist protein; Prognosis

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,目前其发病率在全球居第3位,病死率居第4位,患者5年生存率为50%~60%^[1]。晚期结直肠癌患者对化疗药物敏感性差,预后极差。有研究结果表明:相同TNM分期的结直肠癌患者对化疗药物具有不同的敏感性和预后^[2-3]。Twist蛋白属于碱性螺旋-环-螺旋家族成员,其在肿瘤细胞中高表达,在肿瘤的多药耐药性、上皮-间质转变、抗肿瘤细胞凋亡、肿瘤的侵袭与转移等方面起着重要作用^[4-10]。本研究回顾性分析2005年6-9月我科收治的45例结直肠癌患者的临床病理资料,收集患者行手术切除的结直肠组织标本进行研究,检测Twist蛋白在结直肠癌组织及癌旁组织中的表达,探讨其与结直肠癌患者临床病理特征和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源

本组结直肠癌患者45例,男27例,女18例;年龄33~83岁,平均年龄61岁。所有患者行结直肠癌根治术,并经术后病理学检查明确诊断。45例患者中,结直肠管状腺癌35例,乳头状腺癌5例,黏液腺癌5例。患者术前均未行新辅助治疗。收集手术切除的结直肠癌组织及癌旁组织(距离阴性切缘 ≥ 10 cm)。本研究通过我院伦理委员会审批,患者及家属术前均签署手术知情同意书。

1.2 主要试剂

通用型SP免疫组织化学染色试剂盒、DAB显色试剂盒及山羊抗兔IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。兔抗人Twist单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.3 方法

将收集的标本经4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m连续切片。二甲苯脱蜡,水化,枸橼酸盐缓冲液加热修复抗原10 min,过氧化氢消除内源性过氧

化物酶活性10 min。按SP免疫组化试剂盒说明书进行染色,兔抗人Twist单克隆抗体按1:200稀释。DAB显色,苏木精复染。中性树脂封片。

1.4 结果判定

由2名有经验的病理科医师判定。Twist蛋白表达为细胞质内棕色或棕褐色沉着。每张切片上选取5个高倍视野($\times 400$),每个视野计数200个肿瘤细胞,计算5个视野的平均阳性细胞百分率。平均阳性细胞百分率 $\leq 10\%$ 为0分,11%~25%为1分,26%~50%为2分, $\geq 51\%$ 为3分。染色强度:不染色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。将每张切片平均阳性细胞百分率分值与平均染色强度分值相乘为其染色分数: ≤ 3 分为阴性,4分为弱阳性,6分为阳性,9分为强阳性。将弱阳性、阳性和强阳性定义为阳性,阴性定义为阴性^[11]。

1.5 随访

采用门诊和电话方式进行随访,随访时间截至2013年9月。

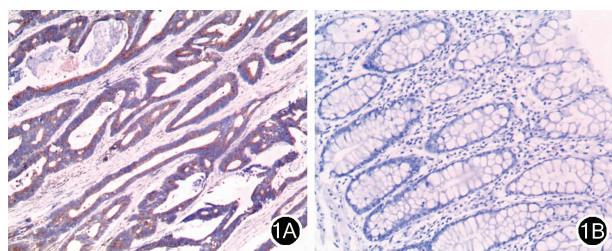
1.6 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件进行分析。计数资料比较采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法。采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,采用Log-rank检验进行生存分析。预后因素分析采用COX单因素和多因素分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色检测Twist蛋白表达情况

Twist蛋白的表达位于组织细胞的细胞质和细胞核,以细胞质为主。结直肠癌组织中Twist蛋白的阳性反应呈染色均一的棕色或棕褐色颗粒(图1A),阳性表达率为62.2%(28/45)。结直肠癌癌旁组织中大部分无Twist蛋白表达(图1B),阳性表达率为20.0%(9/45)。结直肠癌组织中Twist蛋白的阳性表达率高于相应癌旁组织,两者比较,差异有统计学意义($\chi^2=18.383$, $P<0.05$)。



1A:结直肠癌组织中 Twist 蛋白呈阳性表达的棕色或棕褐色颗粒;
1B:结直肠癌癌旁组织中 Twist 蛋白呈阴性表达

图 1 Twist 蛋白在结直肠癌组织及癌旁组织中的表达 免疫组织化学染色 中倍放大

2.2 结直肠癌组织中 Twist 蛋白表达与患者临床病理因素的关系

不同 TNM 分期和淋巴结转移的患者结直肠癌组织中 Twist 蛋白的表达比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而不同性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤浸润深度、远处转移的患者比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 45 例结直肠癌患者临床病理因素与 Twist 蛋白阳性表达率的关系

临床病理因素	例数	Twist 蛋白阳性表达率(%)	χ^2 值	P 值
性别				
男	27	66.7	1.034	>0.05
女	18	55.6		
年龄				
≤60 岁	23	60.9	0.037	>0.05
>60 岁	22	63.6		
肿瘤部位				
结肠	29	58.6	0.450	>0.05
直肠	16	68.8		
肿瘤分化程度				
高分化	8	75.0	$>0.05^a$	
中分化	35	57.1		
低分化	2	100.0		
TNM 分期				
I ~ II 期	19	42.1	5.662	<0.05
III ~ IV 期	26	76.9		
肿瘤浸润深度				
T1 ~ 2 期	5	80.0	0.145	>0.05
T3 ~ 4 期	40	60.0		
淋巴结转移				
N0 期	24	41.7	9.244	<0.05
N1 ~ 2 期	21	85.7		
远处转移				
M0 期	32	56.3	0.916	>0.05
M1 期	13	76.9		

注:^a采用 Fisher 确切概率法

2.3 结直肠癌组织中 Twist 蛋白表达与患者预后的关系

45 例患者均获得术后随访,随访时间为 10 ~ 96 个月,中位随访时间为 54 个月。Twist 蛋白表达阳性的结直肠癌患者中位生存时间为 44 个月,5 年累积生存率为 10.7%;Twist 蛋白表达阴性的结直肠癌患者中位生存时间为 69 个月,5 年累积生存率为 82.4%,两者生存情况比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 26.147, P < 0.05$)。见图 2。

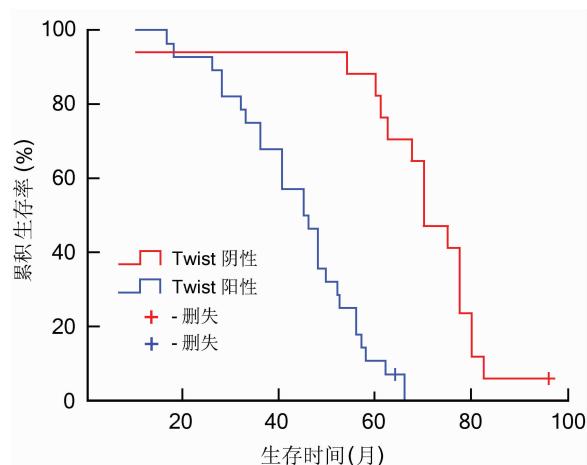


图 2 Twist 蛋白阳性表达与阴性表达的结直肠癌患者的生存曲线

2.4 结直肠癌患者预后因素分析

单因素分析结果显示:Twist 蛋白表达是影响结直肠癌患者预后的相关因素($P < 0.05$)。见表 2。

多因素分析结果显示:Twist 蛋白表达阳性是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素($b = 1.621$, 标准误:0.286, $Wald = 8.624$, $HR = 5.059$, 95% 可信区间:2.888 ~ 8.863, $P < 0.05$)。

3 讨论

Twist 是一种存在于果蝇、鼠及人类等生物体内的高度保守的转录因子,主要表达于胎盘、胚胎中胚层以及成人的某些中胚层来源的未分化组织^[12]。已有的研究表明:Twist 蛋白的高表达与多种肿瘤患者预后密切相关,如乳腺癌、卵巢癌、肝癌、前列腺癌、骨肉瘤等^[13-17]。本研究结果显示:Twist 蛋白在结直肠癌组织中的表达水平高于癌旁组织,这说明 Twist 蛋白可能参与了结直肠癌的发生。Twist 基因可通过多种途径抑制肿瘤细胞凋亡,表现出癌基因的特点^[18-19]。有研究表明:转染 siRNA 抑制 Twist 基因表达后,可通过 p53-Mdm2 途径,减少肿瘤耐药性,从而促进肿瘤细胞凋亡^[20]。Twist 基因还可通过对 AKT 途径的正性调控作用抑制肿瘤细胞凋亡^[21-22]。

表 2 影响 45 例结直肠癌患者预后的单因素分析

临床病理因素	赋值	例数	5 年生存率(%)	<i>b</i> 值	标准误	Wald 值	HR 值	95% 可信区间	<i>P</i> 值
性别									
男	1	27	37.0	0.183	0.311	0.346	1.200	0.653 ~ 2.206	>0.05
女	0	18	38.9						
年龄									
≤60 岁	0	23	43.5	0.008	0.013	0.354	1.008	0.983 ~ 1.034	>0.05
>60 岁	1	22	36.4						
肿瘤部位									
结肠	0	29	41.4	-0.017	0.323	0.003	0.983	0.522 ~ 1.851	>0.05
直肠	1	16	31.3						
肿瘤分化程度									
高分化	1	8	37.5	-0.274	0.417	0.433	0.760	0.336 ~ 1.721	>0.05
中分化	2	35	40.0						
低分化	3	2	0						
TNM 分期									
I ~ II 期	0	19	52.6	-0.809	0.734	2.061	0.445	0.106 ~ 1.875	>0.05
III ~ IV 期	1	26	26.9						
肿瘤浸润深度									
T1 ~ 2 期	0	5	60.0	-0.064	0.509	0.011	0.930	0.346 ~ 2.545	>0.05
T3 ~ 4 期	1	40	35.0						
淋巴结转移									
N0 期	0	24	50.0	0.891	0.683	5.455	2.438	0.639 ~ 9.308	>0.05
N1 ~ 2 期	1	21	23.8						
远处转移									
M0 期	0	32	46.9	0.870	0.494	3.652	0.445	0.106 ~ 1.875	>0.05
M1 期	1	13	15.4						
Twist 蛋白表达									
阴性	0	17	82.4	2.160	0.548	16.342	8.669	2.959 ~ 25.390	<0.05
阳性	1	28	10.7						

上皮间质转化是指上皮细胞-间充质转化的生物过程,其特征为失去上皮细胞表型的同时获得间充质细胞表型^[23]。Twist 基因是上皮间质转化过程中的关键调控因子,可增强肿瘤细胞的移动性。Twist 基因能结合启动子区域的 E-box 序列,抑制 E-CD 蛋白转录,从而介导细胞间的连接^[24]。有研究表明:在乳腺癌小鼠模型中,Twist 基因的上调可引起乳腺癌细胞侵袭、血管内渗能力的升高,利用 RNA 干扰技术沉默 Twist 基因表达,导致乳腺癌细胞转移能力明显受到抑制^[25]。本研究结果显示:不同 TNM 分期和淋巴结转移的结直肠癌患者癌组织中 Twist 蛋白阳性表达率不同,III ~ IV 期结直肠癌患者高于 I ~ II 期,N1 ~ 2 期结直肠癌患者高于 N0 期。结合本研究结果,笔者认为:Twist 蛋白可能与结直肠癌的发展和转移密切相关,可作为反映肿瘤发生、发展的生物学指标之一。

Twist 蛋白不仅在肿瘤发生、发展、侵袭及转移中有促进作用,还与患者预后不良相关。本研究结果显示:Twist 蛋白表达阴性的结直肠癌患者预后优于 Twist 蛋白表达阳性患者,且 Twist 蛋白表达阳性是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素。这提示检测 Twist 蛋白表达水平可作为判断结直肠癌患者预后的重要手段,可能有助于临床医师对结直肠癌患者及时、准确判断预后,实现肿瘤的个体化治疗。

综上所述,Twist 蛋白在结直肠癌中高表达,与结直肠癌的发生、发展、侵袭、转移及预后密切相关,对评价结直肠癌患者预后有一定临床意义。Twist 蛋白可作为恶性肿瘤标志物,这将有助于研究特异性的抗肿瘤侵袭、抗肿瘤耐药性的药物。然而对于 Twist 基因作用的分子机制仍需进一步研究,以期探讨结直肠癌发病的分子机制提供帮助,也为结直肠癌的靶向治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(2):104-117.
- [2] Zlobec I, Lugli A. Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(47):5898-5906.
- [3] 戴朝六, 徐锋. 个体化治疗直肠癌同时性肝转移[J]. 中华消化外科杂志, 2014, 13(3):175-179.
- [4] 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.
- [5] Shiota M, Kashiwagi E, Yokomizo A, et al. Interaction between docetaxel resistance and castration resistance in prostate cancer: implications of Twist1, YB-1, and androgen receptor [J]. Prostate, 2013, 73(12):1336-1344.
- [6] Shiota M, Yokomizo A, Itsumi M, et al. Twist1 and Y-box-binding protein-1 promote malignant potential in bladder cancer cells [J]. BJU Int, 2011, 108(2 Pt 2):E142-149.
- [7] Zhou Y, Huang Z, Wu S, et al. miR-33a is up-regulated in chemoresistant osteosarcoma and promotes osteosarcoma cell resistance to cisplatin by down-regulating TWIST [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33:12.
- [8] Zhu DY, Guo QS, Li YL, et al. Twist1 correlates with poor differentiation and progression in gastric adenocarcinoma via elevation of FGFR2 expression [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(48):18306-18315.
- [9] Kim K, Park EY, Yoon MS, et al. The Role of TWIST in Ovarian Epithelial Cancers [J]. Korean J Pathol, 2014, 48(4):283-291.
- [10] 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.
- [11] 李坤, 陈建明, 蒋耀光, 等. Twist 在食管鳞癌中的表达及其对预后的影响 [J]. 重庆医学, 2008, 37(8):837-839, IV 页.
- [12] Khan MA, Chen HC, Zhang D, et al. Twist: a molecular target in cancer therapeutics [J]. Tumour Biol, 2013, 34(5):2497-2506.
- [13] Zhao M, Hu HG, Huang J, et al. Expression and correlation of Twist and gelatinases in breast cancer [J]. Exp Ther Med, 2013, 6(1):97-100.
- [14] Wang WS, Yu SL, Yang XS, et al. Expression and significance of twist and E-cadherin in ovarian cancer tissues [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(2):669-672.
- [15] Matsuo N, Shiraha H, Fujikawa T, et al. Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2009, 9:240.
- [16] Wallerand H, Robert G, Pasticier G, et al. The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers [J]. Urol Oncol, 2010, 28(5):473-479.
- [17] Man TK, Chintagumpala M, Visvanathan J, et al. Expression profiles of osteosarcoma that can predict response to chemotherapy [J]. Cancer Res, 2005, 65(18):8142-8150.
- [18] Guo P, Gao A, Zhang G, et al. Decoding the knots of initiation of oncogenic epithelial-mesenchymal transition in tumor progression [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(9):996-1011.
- [19] Zhan X, Feng X, Kong Y, et al. JNK signaling maintains the mesenchymal properties of multi-drug resistant human epidermoid carcinoma KB cells through snail and twist1 [J]. BMC Cancer, 2013, 13:180.
- [20] Li QQ, Xu JD, Wang WJ, et al. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(8):2657-2665.
- [21] Li J, Zhou BP. Activation of beta-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.
- [22] Wang H, Zhang G, Zhang H, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/beta-catenin/Snail signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 723:156-166.
- [23] Zheng H, Kang Y. Multilayer control of the EMT master regulators [J]. Oncogene, 2014, 33(14):1755-1763.
- [24] Teng Y, Li X. The roles of HLH transcription factors in epithelial mesenchymal transition and multiple molecular mechanisms [J]. Clin Exp Metastasis, 2014, 31(3):367-377.
- [25] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis [J]. Cell, 2004, 117(7):927-939.

(收稿日期: 2015-02-02)

(本文编辑: 王雪梅)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊征集 2016 年重点选题

《中华消化外科杂志》2016 年将继续刊登重点选题。每期将分别重点介绍消化外科领域的新进展、新技术、新方法、临床及基础研究的热点内容。欢迎广大热心杂志建设的专家、读者、作者通过 Email (Email 地址: digisurg@zhxhwk.com) 或信件 (邮寄地址: 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 29 号西南医院《中华消化外科杂志》编辑部) 提出宝贵建议, 我们将择优采纳。

《中华消化外科杂志》编辑部