

Twist 在胸腺上皮性肿瘤中的表达及预后意义

李发恩 徐林浩[△] 沈毅 赵荣磊

(青岛大学医学院附属医院胸外科 山东青岛 266003)

摘要 目的:检测 Twist 在胸腺上皮性肿瘤的表达及其与预后的关系。方法:应用免疫组织化学 pv6000 法检测 Twist 在 87 例胸腺上皮性肿瘤(胸腺瘤 71 例,胸腺癌 16 例)中的表达情况,分析其与患者各项临床病理指标及预后的关系。结果:Twist 蛋白在胸腺癌的阳性表达(81.3%)显著高于胸腺瘤组织(11.3%),其阳性表达的差异存在统计学意义($P < 0.001$),其在胸腺瘤各亚型之间表达的差异无统计学意义($P > 0.05$)。Twist 阳性表达与胸腺上皮性肿瘤术后发生远处转移呈正相关关系($r = 0.40$, $P = 0.001$)。Kaplan-Meier 生存分析显示 Twist 阳性表达患者术后生存期低于 Twist 阴性表达患者($P < 0.001$)。结论:检测 Twist 蛋白表达情况对于鉴别胸腺瘤与胸腺癌可能有重要的参考价值, Twist 阳性表达可能与术后发生远处转移有关并影响患者术后生存期。

关键词: Twist; 胸腺瘤; 胸腺癌; 免疫组织化学; 预后

中图分类号: R734.5, R655.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)16-3060-04

Significance of Twist Expression in Thymic Epithelial Tumor

LI Fa-en, XU Lin-hao[△], SHEN Yi, ZHAO Rong-lei

(Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and significance of Twist in thymic epithelial tumor. **Methods:** We immunohistochemically investigated the relation between the expression and clinicopathological factors including prognosis in surgical specimens of thymic epithelial tumor in 87 patients including 71 patients with thymomas and 16 specimens of thymic carcinoma. **Results:** Among the 71 thymomas, 8(11.3%) cases were positive for Twist immunoexpression, and 13(81.3%) cases were positive in 16 thymic carcinoma. The expression of Twist was significantly higher in thymic carcinoma than in thymomas ($P < 0.001$). The expression of Twist among subtypes of thymomas (A, AB, B1, B2, B3) is not statistically different ($P > 0.005$). The Twist expression was positively related with distant metastasis after operation ($r = 0.40$, $P = 0.001$). Kaplan-Meier analysis showed that the positive expression of Twist was significantly associated with lower survival rates of patients after operation ($P < 0.001$). **Conclusion:** Evaluation of Twist expression may have significant reference value to distinguish between thymomas and thymic carcinoma. The positive expression of Twist should be associated with the metastasis and survival in postoperative.

Key words: Twist; Thymomas; Thymic carcinoma; Immunohistochemistry; Prognosis

Chinese Library Classification: R734.5, R655.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3060-04

胸腺上皮性肿瘤作为最常见的纵隔肿瘤,约占原发性纵隔肿瘤的 15%,前纵隔肿瘤的 50%,其镜下结构较为复杂,同时存在病理与预后的矛盾,目前对其发生及侵袭、转移的机制尚不十分清楚。近期研究显示, Twist 能抑制细胞凋亡,并通过调节肿瘤细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)促进肿瘤侵袭转移,呈现出癌基因的特点^[1,2]。而 Twist 在胸腺上皮性肿瘤的研究目前尚未见有报道。本实验研究采用免疫组织化学方法检测 Twist 蛋白在胸腺瘤和胸腺癌中的表达,并分析其与患者各项临床病理指标及患者预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2003~2010 年间青岛大学医学院附属医院胸外科手术切除的胸腺上皮性肿瘤石蜡标本 87 例,每例患者均有详细

作者简介:李发恩(1983-)男,硕士研究生,主要研究方向:胸部肿瘤,电话:13386483608, E-mail: lifaen@126.com

[△]通讯作者:徐林浩,硕士研究生导师,

E-mail: qdqyfylinhaoxu@yahoo.com.cn

(收稿日期:2012-03-02 接受日期:2012-03-27)

的临床资料、手术记录和病理报告,术前均未经过放疗、化疗。其中男性 48 例,女性 39 例,年龄 20~82 岁,平均年龄 53 岁。按 WHO(2004 年)标准分型^[3]:胸腺瘤 71 例(其中 A 型 9 例, AB 型 16 例, B1 型 17 例, B2 型 17 例, B3 型 12 例),胸腺癌 16 例。87 例患者均随访至 2011 年 9 月 1 日,无失访,随访期 5~96 个月,平均随访期 68 个月。

1.2 免疫组化染色

1.2.1 主要试剂与方法 鼠抗人 Twist 多克隆抗体(产品编号 ab49254),购自 abcam 公司, pv6000 通用二部法免疫组织化学试剂盒及 DAB 显色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。实验步骤:2 μ m 连续切片,常规脱蜡,水化,3% H₂O₂去离子水孵育 10min 消除内源性过氧化物酶活性,0.01mmol/l 枸橼酸盐缓冲液(PH=6.0)高压、加热修复抗原。正常血清室温下封闭 30min,滴加一抗(稀释浓度 1:40)后置于 37℃ 恒温水浴 30min, PBS 冲洗,滴加相应的二抗。DAB 显色液显色,苏木素复染细胞核,中性树脂胶封片。以已知小鼠肺癌组织阳性片作阳性对照,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.2.2 用 Mattern 积分法^[4]染色指数来评定染色结果 Twist 以

细胞核及细胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性表达。阳性细胞百分率:每例标本选择 10 个含有阳性细胞的高倍视野($\times 400$)分别计数 100 个肿瘤细胞,取其平均值计算阳性细胞百分率。0 为无阳性细胞;1 为阳性细胞 $\leq 25\%$;2 为阳性细胞 $\leq 50\%$;3 为阳性细胞 $>50\%$ 。染色强度:0 为阴性;1 为浅黄色;2 为深黄色;3 为棕黄色。染色指数为阳性细胞百分率和染色强度之和,最小值 0,最大值 6。阳性表达指数 >3 定为免疫组化染色阳性; ≤ 3 定为阴性。

1.3 统计学方法

应用 SPSS17.0 统计软件, Twist 表达与各项临床病理指标间的关系采用 χ^2 检验, 采用 Kaplan-Meier 及 Log-rank 检验估计生存时间及生存期的差异。P <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Twist 在胸腺上皮性肿瘤各种病理分型中的表达情况

Twist 阳性表达产物呈棕黄色, 在胸腺瘤与胸腺癌阳性表达均主要定位于细胞核,在正常胸腺组织无阳性表达。Twist 在胸腺瘤组阳性表达为 11.3%(8/71), 胸腺癌中阳性表达为 81.3%(13/16)。其中在胸腺瘤亚型 A、AB、B1、B2、B3 中的阳性表达分别为: 10.0%(1/10)、12.5%(2/16)、11.8%(2/17)、12.5%(2/16)、8.3%(1/11)。其阳性表达在胸腺瘤各亚型之间(A、AB、B1、B2、B3)的差异无统计学意义(P >0.05),在胸腺瘤与胸腺癌组间阳性表达差异存在统计学意义(P <0.001),见图 1,表 1.1、1.2。

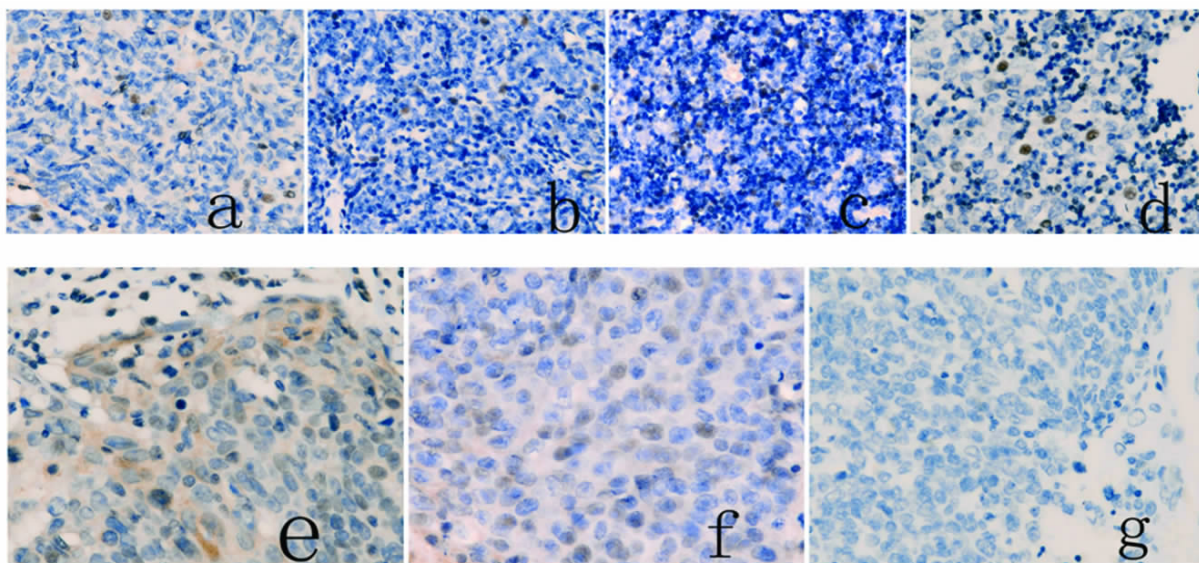


图 1 a、b、d 分别表示 twist 在 A、AB、B2 型胸腺瘤中散在细胞核阳性表达 c、e、f 分别表示在有术后转移的 B1、B3 型胸腺瘤及胸腺癌中的广泛细胞核阳性表达 g 为胸腺癌的阴性对照 (pv6000 法 $\times 400$)

Fig.1 a, b, d respectively indicate the positive nucleus expression of twist in type A, AB, B2 thymoma; c, e, f respectively indicate the positive nucleus expression of twist in type B1, B3 thymoma with distant metastases after operation; f indicates the positive nucleus expression of twist in thymic carcinoma; g indicates the negative control of thymic carcinoma.

表 1.1 Twist 在胸腺瘤各亚型中的表达

Table 1.1 The expression of twist in subtypes of thymomas

WHO Classification	Cases	Twist		χ^2	P
		+	-		
A	10	1	9	0.582	>0.05
AB	16	2	14		
B1	17	2	15		
B2	16	2	14		
B3	12	1	11		

表 1.2 Twist 在胸腺瘤与胸腺癌组间的表达

Table 1.2 The expression of twist in thymomas and thymic carcinoma

Groups	Cases	Twist		χ^2	P
		+	-		
胸腺瘤 Thymoma	71	8	63	31.20	<0.001
胸腺癌 Thymic carcinoma	16	13	3		

2.2 Twist 表达与各项临床病理指标的关系

在 87 胸腺上皮肿瘤例标本中,有术后转移的标本 twist 呈广泛细胞核阳性表达,见图 1(c、e、f)。Twist 阳性表达组术后发生远处转移率 38.1%(8/21) 高于阴性表达组术后远处转移率

6.5%(4/62),两组差异具有统计学意义。Twist 阳性表达与患者术后肿瘤远处转移正相关($r=0.40, P=0.001$) 而与患者年龄、性别、Masaoka 分期及有无合并肌无力无关($P>0.05$),见表 2。

表 2 Twist 表达与各项临床病理指标的关系

Table 2 The relationship between the expression of Twist and the clinicopathological parameters

项目 Items	N	Twist		χ^2	P
		+	-		
年龄 Age				0.123	0.726
<60 岁 Year	36	8	28		
≥ 60 岁 Year	51	13	38		
性别 Gender				0.087	0.768
男 Male	48	11	37		
女 Female	39	10	29		
Masaoka 分期 Stages				0.324	0.851
I	50	13	37		
II	26	6	20		
III-IV	11	2	9		
合并肌无力 Myasthenia complication				0.249	0.618
有 With	54	14	40		
无 Without	33	7	26		
术后远处转移 Distant metastases after operation				11.187	0.001
有 With	12	8	4		
无 Without	75	13	62		

2.3 Twist 表达与患者术后生存期的关系

研究发现 Twist 阳性表达 21 例,其中死亡 15 例, Twist 阴性表达 66 例,其中死亡 10 例。对所有患者进行 Kaplan-Meier 生存分析(见图 2)及对数秩和检验(Log-rank test),结果显示 Twist 阳性表达组患者平均生存期 30.48 2.96 个月,中位生存期 32.0 2.86, Twist 阴性表达组患者平均生存期 86.81 2.58 个月。Twist 阳性表达组患者平均生存期低于 Twist 阴性表达组患者,两组间差异具有统计学意义($P<0.001$)。

3 讨论

Twist 基因属于一种高度保守的碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)转录因子家族,其编码的 202 个氨基酸组成的 Twist 蛋白通过形成二聚体发挥转录因子的作用,在胚胎发育、诱导细胞移动及组织塑型中起重要作用,广泛参与调控器官生长发育、细胞增殖分化和肿瘤发生等。近来研究表明 Twist 具有癌基因的特征,通过编码凋亡抑制蛋白作用于多条途径促进恶性肿瘤的发生及转移。迄今已在多种人类上皮来源肿瘤中观察到 Twist 表达增高,并与肿瘤侵袭转移及患者术后生存关系密切,食管癌^[5]、肝细胞癌^[6]等。

实验发现,胸腺癌组织中 Twist 蛋白的表达水平显著高于正常胸腺组织和胸腺瘤组织($P<0.001$)。实验中观察到胸腺癌肿瘤细胞异型性越明显, Twist 表达越强,阳性细胞越多、染色越深,而异型性较小的胸腺瘤细胞 Twist 蛋白表达较弱。这表明 Twist 具有癌基因的特征,它的激活可能是胸腺癌发生的因素之一。研究表明恶性程度较高、侵袭性较强的肿瘤亚型常高表达 Twist 蛋白,而正常组织及恶性程度较低的肿瘤细胞中低表达或不表达 Twist 蛋白^[7]。Twist 促进肿瘤形成的机制可能是① Twist 可影响 p53 依赖性和非依赖性通路来调控凋亡,促进肿瘤的形成^[8]。② Twist 上调可促进血管内皮生长因子的表达,促进肿瘤血管生成^[9]。③ Twist 还能抑制 NF- κ B / TNF 等通路介导的肿瘤细胞的抗凋亡机制^[10]。Twist 蛋白在胸腺癌中高表达,

生存函数

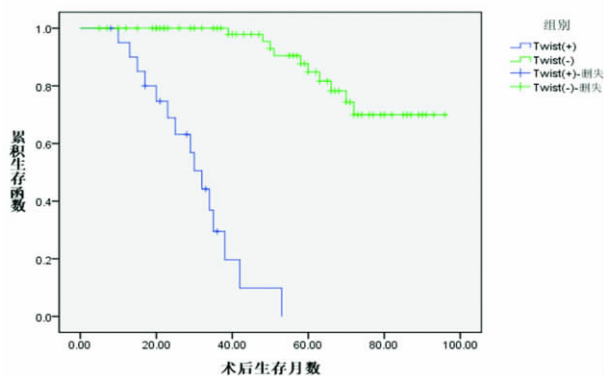


图 2 Twist 表达与胸腺上皮性肿瘤患者术后生存时间的 Kaplan-Meier 生存曲线

Fig.2 Kaplan-Meier survival curve of the thymic epithelial neoplasm patients after operation

提示 Twist 蛋白可能参与了胸腺癌的发生过程,其表达情况可作为鉴别胸腺癌与胸腺瘤的指标之一。

研究结果显示, Twist 阳性表达的胸腺上皮性肿瘤病例更易发生远处转移且预后较差($P=0.001$)。这可能是由于 Twist 能促进上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 增强了肿瘤细胞的移动性。EMT 是指具有极性的上皮细胞失去细胞间紧密连接和黏附连接, 细胞骨架重塑, 转换成为具有活动能力的间质细胞并获得侵袭和迁移能力的过程^[11]。Twist 能与 E-cadherin 基因启动子上的 E-box 序列结合, 抑制 E-cadherin 的转录, 而 E-cadherin 是介导细胞间连接的重要因子^[12]。Yang 等^[13]在研究小鼠乳腺癌模型时发现, Twist 基因上调可显著增强肿瘤细胞侵袭及血管内渗能力, 应用 RNA 干扰技术下调 Twist 表达可显著降低乳腺癌细胞株 4T1 肺转移几率。Ylirmi 等^[14]研究发现, Twist 在乳腺癌细胞核阳性表达与患者预后显著正相关, 并且对于预测术后乳腺癌扩散具有重要意义。

本实验研究结果显示, Twist 蛋白阳性表达患者术后易发生远处转移且预后较差, Twist 蛋白有可能成为胸腺瘤与胸腺癌鉴别的一个参考指标。但有关胸腺上皮性肿瘤发生发展及侵袭转移的机制尚未完全阐明, 可能还有其它信号分子参与调控, 这有待于进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of pre-mature senescence[J]. Cancer Cell, 2008, 14(1):79-89
- [2] Luo GQ, Li JH, Wen JF, et al. Effect and mechanism of the Twist gene on invasion and metastasis of gastric carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(16):2487-2493
- [3] 孟宇宏, 张建中. 肺、胸膜、胸腺及心脏肿瘤病理学和遗传学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006:168-169
Meng Yu-hong, Zhang Jian-zhong. Pathology & Genetic Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2006:168-169
- [4] Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling [J]. Nature, 2000, 406(6795): 536-540
- [5] Ken Sasaki, Shoji Natsugoe, Sumiya Ishigami, 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: 158-167
- [6] Muh-Hwa Yang, Chih-Li Chen, Gar-Yang Chau, 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
- [7] Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, et al. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival [J]. Hum Pathol, 2006, 37(4):431-438
- [8] Stasiopoulos IA, Mironchik Y, Raman A, et al. HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2005, 280(3):2294-2299
- [9] Mironchik Y, Winnard PT Jr, Vesuna F, et al. Twist over expression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(23):10801-10809
- [10] Susic D, Richardson JA, Yu K, et al. Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF- κ B activity[J]. Cell, 2003, 112(2):169-180
- [11] Douglas S Micalizzi, Heide L Ford. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer [J]. Future Oncology, 2009, 5(8): 1129-1143
- [12] Farhad Vesuna, Paul van Diest, Ji Hshiang Chen, et al. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(2):235-241
- [13] Yang J, Mani SA, Donaher J L, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. Cell, 2004, 117(7):927-939
- [14] Ylirmi Soini, Hanna Tuhkanen, Reijo Sironen, et al. Transcription factors zeb1, twist and snail in breast carcinoma [J]. BMC Cancer, 2011, 11:73