

宫颈癌组织中 Twist 与 E-cadherin 蛋白的表达及其意义

张荣荣,王 红,张 萍

(上海交通大学医学院附属新华医院妇科,上海 200092)

【摘要】 目的 研究 Twist 与 E-cadherin 蛋白在宫颈炎、宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中的表达水平,分析其在宫颈癌中的作用。方法 选取宫颈炎(20 例)、宫颈上皮内瘤变(40 例)和宫颈鳞状细胞癌(40 例)的石蜡标本为研究对象,采用免疫组织化学方法检测 Twist 与 E-cadherin 蛋白在上述宫颈组织中的表达情况,分析其临床意义。结果 ①宫颈细胞胞质、胞核均可见 Twist 蛋白表达,以胞质表达更明显,其阳性率随恶性程度增加而逐渐增多;E-cadherin 蛋白主要在细胞膜表达,其阳性率随恶性程度增加而降低。Twist 和 E-cadherin 蛋白在宫颈炎、CIN 及宫颈鳞癌组织中表达差异有统计学意义($P<0.05$)。②在宫颈鳞癌组织中, Twist 蛋白在有淋巴结转移的病例中高表达, E-cadherin 蛋白仅在部分无淋巴结转移的病例中少量表达。Twist 和 E-cadherin 蛋白阳性率在不同淋巴结转移差异有统计学意义($P<0.05$),而在不同 FIGO 分期、不同肿瘤分化程度以及不同淋巴血管间隙浸润的组织中差异无统计学意义($P>0.05$)。经 Spearman 相关性分析, Twist 蛋白与 E-cadherin 蛋白存在负相关性($r=-0.561, P<0.05$)。结论 在宫颈癌变过程中 Twist 蛋白表达逐渐增加, E-cadherin 蛋白表达逐渐降低,其介导的上皮间质化及两种蛋白的表达水平有助于判断肿瘤分化程度及转移潜能。

【关键词】 Twist; E-cadherin 蛋白; 宫颈癌

【中图分类号】 R737.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2013)08—1105—03

Expression of Twist and E-cadherin protein in cervical cancer tissue and their significance. ZHANG Rong-rong, WANG Hong, ZHANG Ping. Department of Gynecology, Xin Hua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the expression levels of Twist and E-cadherin protein in cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer, and to analyze their roles in cervical cancer. **Methods** Paraffin-embedded samples of cervicitis (20 cases), cervical intraepithelial neoplasia (40 cases) and cervical squamous cell carcinoma (40 cases) were the research objects. The expression of Twist and E-cadherin protein was detected with immunohistochemical method in the cervical tissues, and the clinical significance was analyzed. **Results** ① Cervical cell cytoplasm, nuclei were detected with the expression of Twist protein, especially in cytoplasm, and the positive rate increased with the aggravation of malignancy. E-cadherin protein was mainly expressed in the cell membrane, and the positive rate decreased with increasing malignancy. Twist and E-cadherin protein expression in cervicitis, CIN and cervical squamous cell carcinoma has significant difference ($P<0.05$) in cervical squamous cell carcinoma, Twist protein in the high expression of lymph nodes metastasis, E-cadherin protein only in part without lymph node metastasis cases less expression. The positive rates of Twist and E-cadherin protein in different lymph node metastasis had significant differences ($P<0.05$), while no statistically significant difference was found in different FIGO stage, tumor differentiation degree and different organizations of different lymph vascular space invasion ($P>0.05$). Spearman correlation analysis showed a negative correlation between Twist protein and E-cadherin protein ($r=-0.561, P<0.05$). **Conclusion** In the development of cervical carcinoma, Twist protein expression increased gradually, and the expression of E-cadherin protein decreased gradually. Epithelial mesenchymal mediated by the two proteins and their expression levels help determine the degree of tumor differentiation and metastasis.

【Key words】 Twist; E-cadherin protein; Cervical cancer

宫颈癌是临床常见的生殖系统恶性肿瘤,发生率仅次于乳腺癌,并呈逐年上升趋势。传统观点认为乳头状病毒(Human papillomavirus, HPV)是宫颈癌诱发的必要条件,近年来研究发现基因不稳定性在宫颈

癌的发生、发展中也具有重要作用。Twist 是一种转录调控因子,在胚胎细胞生长发育、细胞迁移的诱导过程中具有重要作用,例如可识别靶基因启动子上的 DNA 结合序列,在转录水平诱导上皮间质化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)

lial-mesenchymal, EMT), 抑制 E-cadherin 的表达^[1]。EMT 被认为是肿瘤侵袭、转移发展中的重要事件, 在绝大多数恶性肿瘤中都存在 E-cadherin 介导的细胞粘附功能降低或丧失, 例如胃癌、前列腺癌、肝癌、乳腺癌等等, 随着粘附功能丧失, 这些恶性肿瘤细胞转移、侵袭能力增加^[2-3]。本文旨在研究 Twist 与 E-cadherin 蛋白在宫颈炎、宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中的表达水平, 分析 Twist 及 E-cadherin 在宫颈癌中的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选取 2009 年 11 月至 2012 年 8 月我院妇科门诊及住院病例的石蜡组织标本为研究对象, 均经病理学诊断确诊, 包括宫颈炎 (20 例)、宫颈上皮内瘤变 (Cervical intraepithelial neoplasia, CIN) (40 例) 和宫颈鳞状细胞癌 (40 例)。宫颈鳞癌患者年龄范围 32~65 岁, 中位年龄 51 岁; 肿瘤分期依据国际妇产联盟标准 (FIGO 分期), I~II A 期石蜡切片 32 例, II B~III A 期 8 例; 术后病理示低/未分化 11 例, 高/中分化 29 例, 术前均未接受放、化疗以及内分泌治疗。

1.2 试验材料和方法 所有标本均经 4% 甲醛固定, 石蜡包埋保存。切片以 4 μ m 连续切片后常规脱蜡, PBS 冲洗三遍, 并滴加 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶。然后将切片置入枸橼酸缓冲液中, 微波抗原修复 30 min。室温下冷却后擦干, 滴加胎牛血清并在 37℃ 下孵育 1 h。滴加一抗 (Twist 多克隆抗体或 E-cadherin 多克隆抗体) 并在 4℃ 过夜。次日 PBS 冲洗三遍, 滴加生物素标记二抗, 在 37℃ 温箱中孵育 1 h, PBS 冲洗三遍, 滴加辣根酶工作液, 37℃ 温箱孵育 1 h, PBS 冲洗三遍后 DAB 染色。水洗后擦干, 苏木素复染, 脱水、透明后封片, 置入显微镜下观察。阴性对照以同种属性 IgG 为一抗, 流程同上。鼠抗人 Twist 多克隆抗体和兔抗人 E-cadherin 多克隆抗体均购自美国 Abcam 公司, 免疫组织化学 SP 二抗工作液、DAB 显色剂购自上海长岛生物技术公司。

1.3 观察指标和评价标准 观察 Twist 和 E-cadherin 蛋白在胞核、胞质、胞膜上的表达情况, 参

照文献^[4]中综合染色强度和阳性细胞评价免疫组化阳性结果, 结果判定采用双盲对照法, 分为弱阳性 (+)、阳性 (++) 和强阳性 (+++) 三个等级。

1.4 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件包进行统计学分析, 采用 χ^2 检验和 Mann-Whitney *U* 检验, 多组数据阳性率 (%) 采用秩和检验, 两种蛋白表达的相关性采用 Spearman 相关性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Twist 和 E-cadherin 蛋白在不同宫颈组织中的表达 ① 宫颈细胞胞质、胞核均可见 Twist 蛋白表达, 以胞质表达更明显, 其阳性率随恶性程度增加而逐渐增多。Twist 蛋白在宫颈炎的上皮细胞中阳性率为 10%, 弱阳性和阳性均为 5%; CIN 中阳性率为 40%, 弱阳性为 20%, 阳性为 15%; 宫颈鳞癌中阳性率为 75.0%, 并且 52.5% 为阳性或强阳性。② E-cadherin 蛋白主要在细胞膜表达, 其阳性率随恶性程度增加而降低。慢性宫颈炎切片中, E-cadherin 蛋白在宫颈上皮细胞膜着色, 分布特点具有连续性, 在宫颈鳞癌组织切片中, 癌细胞膜着色浅淡或者完全不着色, 呈点状分布。E-cadherin 蛋白在宫颈炎的上皮细胞中阳性率为 90%, 阳性为 35%, 强阳性 40%; CIN 中阳性率为 57.5%, 弱阳性为 30%, 阳性为 25%; 宫颈鳞癌中阳性率为 22.5%, 20% 为弱阳性表达。经比较发现, Twist 和 E-cadherin 蛋白在宫颈炎、CIN 及宫颈鳞癌组织中表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 Twist 和 E-cadherin 蛋白的表达与宫颈鳞癌病理特征的关系 在宫颈鳞癌组中, Twist 蛋白在有淋巴结转移的病例中高表达, E-cadherin 蛋白仅在部分无淋巴结转移的病例中少量表达。Twist 和 E-cadherin 蛋白阳性率在不同淋巴结转移差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在不同 FIGO 分期、不同肿瘤分化程度、以及不同淋巴血管间隙浸润的组织中差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。经 Spearman 相关性分析, Twist 蛋白与 E-cadherin 蛋白存在负相关性 ($r = -0.561, P < 0.05$), 见表 2。

表 1 Twist 和 E-cadherin 蛋白在不同宫颈组织中的表达 [例 (%)]

病变类型	例数	Twist				E-cadherin			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
宫颈炎	20	18(90.0)	1(5.0)	1(5.0)	0(0)	2(10.0)	3(15.0)	7(35.0)	8(40.0)
CIN	40	24(60.0)	8(20.0)	6(15.0)	2(5.0)	17(42.5)	12(30.0)	10(25.0)	1(2.5)
宫颈鳞癌	40	10(25.0)	9(22.5)	11(27.5)	10(25.0)	31(77.5)	8(20.0)	1(2.5)	0(0)

表 2 Twist 和 E-cadherin 蛋白的表达与宫颈鳞癌病理特征的关系

病理学特征	类别	例数	Twist (n=30)		E-cadherin (n=9)	
			+	-	+	-
FIGO 分期	I ~ II A	32	24	8	7	25
	II B ~ III A	8	6	2	2	6
肿瘤分化程度	中/高分化	29	22	7	7	22
	低/未分化	11	8	3	3	8
淋巴血管间隙浸润	无	26	20	6	6	20
	有	14	10	4	3	11
淋巴结转移	无	29	19	10	9	20
	有	11	11	0	0	11

3 讨 论

宫颈癌是妇科常见恶性肿瘤之一,目前国内外对 Twist 与 E-cadherin 蛋白在宫颈癌中的作用报道较少。有不少报道发现 Twist 与 E-cadherin 蛋白在其他恶性肿瘤的发生、发展中具有重要作用。Niu 等^[5]学者的研究发现 Twist 蛋白在肝癌组织高度表达,其在肝癌细胞转移以及形成新生血管等方面发挥着重要作用。人胶质瘤细胞系中, Twist 蛋白阳性率与肿瘤细胞分化和临床分级具有正相关性,胶质瘤级别越高,侵袭能力越强, Twist 蛋白的表达以及 Twist mRNA 水平也越高^[6],因此探讨其在 CIN、宫颈鳞癌发生、发展中的作用具有重要的临床意义。

本次研究中对宫颈炎症、CIN 及宫颈鳞癌的免疫组化结果, Twist 蛋白表达阳性率随恶性程度增加而逐渐增多, E-cadherin 蛋白主阳性率随恶性程度增加而降低。 Twist 和 E-cadherin 蛋白在宫颈炎和 CIN 中的表达差异有统计学意义,提示上皮间质化在上皮内瘤变期就已经开始。对比两种蛋白在 CIN 与宫颈鳞癌中的表达,差异也具有统计学意义,进一步分析 Twist 和 E-cadherin 蛋白与宫颈鳞癌病理特征的关系, Twist 蛋白在有淋巴结转移的病例中高表达, E-cadherin 蛋白仅在无淋巴结转移的病例中少量表达,提示上皮间质化在肿瘤的淋巴结转移中具有重要作用。Kyo 等^[7]学者用发现 Twist 蛋白在 51% 的浸润性子宫颈内膜癌中高度表达,并且其表达水平与肿瘤浸润深度呈正相关,并伴随 E-cadherin 蛋白表达降低。也有学者认为 Twist 的表达与肿瘤的迁徙、转移能力相关,与 FIGO 分期、病理分级、绝经期等无相关性。

Twist 蛋白是肿瘤细胞发生上皮间质化,并获得迁徙、转移和侵袭能力的主要诱导因子^[8], Twist/Mi2/NuRD 的蛋白复合物可结合 E-cadherin 启动子区域,抑制 E-cadherin 蛋白的表达,降低其细胞连接作用,从而诱导上皮间质化^[9]。研究发现,包括 E-cadherin

蛋白在内的许多基因的转录活性的调节受 Twist 蛋白调控,使其转录水平受到抑制。上皮间质化的典型病理过程为细胞膜 E-cadherin 的表达逐渐减弱,直至消失,引起细胞间的连接作用减弱^[10]。无侵袭能力的肿瘤细胞,在 E-cadherin 表达下调或功能降低的情况下,可能会获得侵袭能力,发生迁徙、转移。在绝大多数癌性肿瘤中,如乳腺癌、肝细胞癌、胃癌、前列腺癌、食管癌、肺癌等都存在 E-cadherin 表达降低,说明这些恶性肿瘤细胞间的粘附功能降低或丧失,使其获得迁徙、转移能力,脱离原发病灶浸润周围组织或向远处转移。慢性宫颈炎切片中, E-cadherin 蛋白在细胞膜表达较多,呈连续性,而在宫颈鳞癌组织切片中,癌细胞膜着色浅淡或者完全不着色,呈点状分布,提示 Twist 蛋白的表达与癌细胞的侵袭、迁徙能力有关,也可说明 Twist 与 E-cadherin 蛋白参与了宫颈癌发生、发展的机制,与其他恶性肿瘤具有一致性。

参 考 文 献

[1] 张莉莉, 张淑兰. Twist 基因与妇科肿瘤发生发展的关系[J]. 国际妇产科杂志, 2010, 37(2): 104-107.

[2] 宫奇林, 林梅青, 时昌文, 等. Twist 基因检测对大肠癌临床病理诊断价值的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(16): 1259-1274.

[3] Lee TK, Poon RT, Yuen AP, et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(18): 5369-5376.

[4] Shibata K, Kajiyama H, Ino K, et al. Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome [J]. Ann Onco, 2008, 19(1): 81-85.

[5] Niu RF, Zhang L, Xi GM, et al. Up-regulation of Twist induces angiogenesis and correlates with metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2007, 26(3): 385-394.

[6] Elias MC, Tozer KR, Silber JR, et al. Twist is expressed in human gliomas and promotes invasion [J]. Neoplasia, 2005, 7(9): 824-837.

[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] Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by Twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence [J]. Cancer Cell, 2008, 14(1): 81-85.

[9] Fu J, Qin L, He T, et al. The Twist/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis [J]. Cell Res, 2010, 21(2): 275-289.

[10] Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis [J]. Cancer Sci, 2003, 94(7): 575-581.

(收稿日期: 2012-12-07)