

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.10.005

· 基础研究 ·

Twist和Vimentin蛋白在口腔鳞状细胞癌中的表达及其意义

高文峰¹, 王治平¹, 许竞¹, 宋治锋², 曾曙光¹

1. 南方医科大学口腔医院口腔颌面外科, 广东 广州(510280); 2. 上海市口腔病防治院口腔综合科, 上海(200001)

【摘要】目的 探讨Twist和Vimentin蛋白在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)中的表达情况及其临床意义。**方法** 收集85例OSCC标本和15例正常口腔黏膜组织标本,应用免疫组化SP法检测在标本中Twist和Vimentin蛋白的表达水平,分析其与口腔鳞癌患者临床病理因素的相关性。**结果** Twist蛋白在正常组织中的阳性率为13.3%(2/15),在OSCC组织的阳性率为80.0%(68/85),两组相比差异具有统计学意义($\chi^2 = 26.98, P < 0.001$),同时其在OSCC中的表达与性别($\chi^2 = 0.23, P = 0.63$)、年龄($\chi^2 = 0.31, P = 0.58$)、部位($\chi^2 = 1.46, P = 0.23$)、组织学分化($\chi^2 = 1.52, P = 0.47$)等因素无关,与临床分期($\chi^2 = 5.40, P = 0.02$)、淋巴结转移($\chi^2 = 8.35, P = 0.006$)等因素有关;Vimentin蛋白在正常组中的阳性率为6.7%(1/15),在OSCC组中为74.1%(63/85),两组差异有统计学意义($\chi^2 = 20.71, P < 0.001$),同时其表达与性别($\chi^2 = 0.40, P = 0.53$)、年龄($\chi^2 = 0.17, P = 0.68$)、部位($\chi^2 = 0.74, P = 0.39$)、组织学分化($\chi^2 = 4.58, P = 0.10$)等因素无关,与临床分期($\chi^2 = 4.51, P = 0.034$)、淋巴结转移($\chi^2 = 6.75, P = 0.009$)等因素有关。Spearman等级相关分析显示, Twist与Vimentin蛋白存在正相关($r = 0.578, P < 0.05$)。**结论** 在OSCC中Twist和Vimentin蛋白表达增加,并且两者存在正相关关系,提示在OSCC中两者可能共同参与肿瘤的发生和发展。

【关键词】 口腔鳞癌; Twist蛋白; Vimentin蛋白; 上皮间质转化; 免疫组化

【中图分类号】 R783.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)10-0639-05

【引用著录格式】 高文峰,王治平,许竞,等. Twist和Vimentin蛋白在口腔鳞状细胞癌中的表达及其意义[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(10): 639-643.

Significance of the levels of Twist and Vimentin proteins in oral squamous cell carcinoma GAO Wenfeng¹, WANG Zhiping¹, XU Jing¹, SONG Zhifeng², ZENG Shuguang¹. 1. Department of oral and maxillofacial surgery, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 2. Shanghai Stomatological Hospital, Shanghai 200001, China

Corresponding author: SONG Zhifeng, Email: szf411@163.com, Tel: 0086-21-64723179; ZENG Shuguang, Email: sunrise@doctor@163.com, Tel: 0086-20-84403311

【Abstract】 Objective To investigate the levels of the Twist and Vimentin proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and analyze the clinical significance of Twist and Vimentin. **Methods** Eighty-five samples of OSCC and fifteen samples of normal oral mucosa were collected. Immunohistochemistry (SP method) was used to detect the expression of proteins, including Twist and vimentin. The relationship among these proteins and clinical pathological parameters was analyzed using SPSS statistical software. **Results** In the normal group, 13.3% (2/15) of samples were positive for the Twist protein; this value was significantly lower than that in OSCC group (80.0%, 66/85) ($\chi^2 = 26.98, P < 0.001$). The expression of Twist was associated with clinical stage ($\chi^2 = 5.40, P = 0.02$) and lymph node metastasis ($\chi^2 = 8.35, P = 0.006$), while no correlations were found between the expression of Twist and sex ($\chi^2 = 0.23, P = 0.63$), age ($\chi^2 =$

【收稿日期】 2018-05-17; **【修回日期】** 2018-07-03

【基金项目】 广东省医学科学技术研究基金项目(A2015215)

【作者简介】 高文峰,副主任医师,硕士, Email: 399565@qq.com

【通信作者】 宋治锋,主任医师,硕士, Email: szf411@163.com, Tel:0086-21-64723179

曾曙光,主任医师,博士, Email: sunrise@doctor@163.com, Tel: 0086-20-84403311

0.31, $P = 0.58$), location ($\chi^2 = 1.46$, $P = 0.235$) or degree of differentiation ($\chi^2 = 1.52$, $P = 0.47$). Additionally, 6.7% of samples (1/15) were positive for vimentin; this value was significantly lower than that in OSCC group (74.1%, 63/85) ($\chi^2 = 20.71$, $P < 0.001$). The expression of vimentin was associated with clinical stage ($\chi^2 = 4.51$, $P = 0.034$) and lymph node metastasis ($\chi^2 = 6.75$, $P = 0.009$), while no correlations were found between the expression of vimentin and sex ($\chi^2 = 0.40$, $P = 0.53$), age ($\chi^2 = 0.17$, $P = 0.68$), location ($\chi^2 = 0.74$, $P = 0.39$) or degree of differentiation ($\chi^2 = 4.58$, $P = 0.10$). Spearman correlation analyses showed that Twist protein expression was positively correlated with vimentin ($r = 0.578$, $P < 0.05$). **Conclusion** Our data demonstrate that in OSCC, Twist and vimentin levels were upregulated, and Twist protein expression was positively correlated with vimentin, which indicates that both Twist and vimentin may be involved in the occurrence of OSCC.

【Key words】 Oral squamous cell carcinoma; Twist protein; Vimentin protein; Epithelial-mesenchymal transition; Immunohistochemistry

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,具有恶性程度高、易早期转移和预后较差等特点,其侵袭与转移能力强是影响 OSCC 患者预后的其中一个重要因素,早期发现和治疗是提高其预后的重要手段。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤形成及侵袭转移中非常重要的过程。转录因子 Twist 是肿瘤转移的重要调控基因之一,在多种肿瘤组织中高表达,并具有调控 EMT 的作用^[1-4],但在 OSCC 中的作用尚未完全清楚。本研究旨在通过免疫组化技术检测在 OSCC 组织中 Twist 蛋白与 EMT 表型分子波形蛋白(vimentin)的表达情况,分析其与各因素的相关关系,探讨 Twist 蛋白在 OSCC 发生发展中所起的作用及其与 EMT 的关系。

1 资料和方法

1.1 标本来源

收集 2010~2016 年间南方医科大学口腔医院 OSCC 的活检标本(全部为临床初诊活检病例,患者术前均未采用化疗、放疗治疗)85 例,并收集因外伤而切除的正常口腔黏膜标本 15 例作为对照。所有患者均知情同意。OSCC 组患者中男 47 例,女 38 例;年龄 28~86 岁,中位年龄为 51 岁。正常组中男 8 例,女 7 例,年龄 18~46 岁,中位年龄为 31 岁。OSCC 病例按 WHO 诊断标准,由口腔病理医师确诊和分级,其中 OSCC I 级 25 例,II 级 33 例,III 级 27 例。

1.2 主要试剂

一抗 Twist 兔抗人多克隆抗体浓缩型(Santa Cruz 公司,美国),工作浓度 1:100;Vimentin 鼠抗人单克隆抗体即用型、二抗链霉素抗生物素蛋白-过

氧化物酶(streptavidin- peroxidase, SP)试剂盒和 3,3-二氨基联苯胺(3,3-diaminobenzidine, DAB)显色液(福州迈新生物技术公司,中国)。

1.3 实验方法

所有标本均经 10% 福尔马林液固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片。常规脱蜡、脱水,微波热处理修复抗原,按 SP 法免疫组织化学染色试剂盒说明书步骤操作,DAB 显色,苏木素复染,中性树脂封片。以 PBS 代替一抗作为空白对照。置于显微镜下观察染色情况。

1.4 免疫组织化学结果判定

显微镜下随机选择 5 个高倍视野($\times 400$),采用半定量积分法判断结果^[4]:首先计数阳性细胞所占的百分比,按阳性细胞百分率判定:阳性细胞比例 $< 10\%$ 为 0 分,11%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分;其次根据染色程度判定:不着色为 0 分,浅黄色为 1 分,深黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两者积分相乘,本研究中以积分 ≤ 3 分定为阴性(-), > 3 分定为阳性(+).

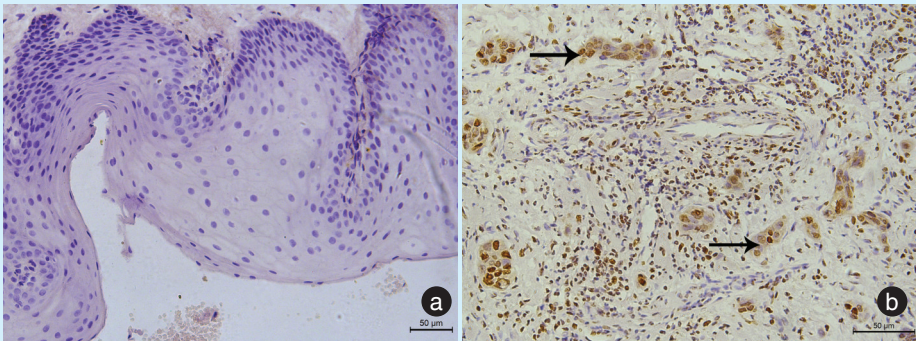
1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学分析,各计数资料采用 χ^2 检验, Twist 和 Vimentin 蛋白之间的相关性分析采用 spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Twist 蛋白在各组中的分布情况

Twist 蛋白阳性主要定位于细胞核,部分见于细胞质,呈棕黄色颗粒。Twist 蛋白在正常组中的阳性率为 13.3%(2/15),在 OSCC 组中的阳性率为 80.0%(68/85),差异有统计学意义($\chi^2 = 26.98$, $P < 0.001$, 图 1)。



a: 正常组织中 Twist 蛋白阴性表达;b:OSCC 组中 Twist 蛋白阳性表达。→: 示阳性

图 1 Twist 蛋白在各组中的表达(免疫组化染色 × 200)

Figure 1 The expression of Twist in the OSCC and normal groups (Immunohistochemical staining × 200)

Twist 蛋白的表达与临床分期、淋巴结转移等因素的差异有统计学意义($P < 0.05$),与性别、年龄、部位、组织学分化等因素的差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

表 1 OSCC 组中 Twist 和 Vimentin 的表达与各因素的关系

Table 1 The relationship between the expression of Twist and Vimentin with OSCC parameters

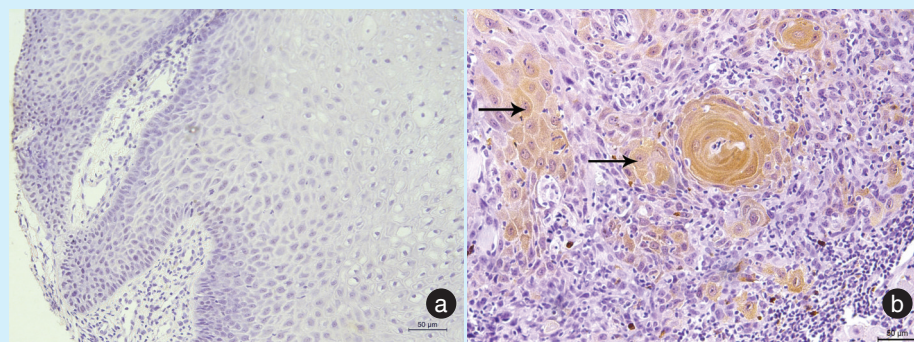
因素	样本例数	Twist				Vimentin			
		阴性	阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值	阴性	阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄									
< 50 岁	38	7	31	0.31	0.58	9	29	0.17	0.68
≥ 50 岁	47	11	36			13	34		
性别									
男	47	12	35	0.23	0.63	14	33	0.40	0.53
女	38	8	30			9	29		
肿瘤部位									
舌	49	12	37	1.46	0.23	15	34	0.74	0.39
其它	36	5	31			8	28		
临床分期									
I - II 期	34	11	23	5.40	0.02	13	21	4.51	0.034
III - IV 期	51	6	45			9	42		
淋巴结转移									
无	36	13	23	8.35	0.006	15	21	6.75	0.009
有	49	5	44			8	41		
组织学分化									
I	25	7	18	1.52	0.47	11	14	4.58	0.10
II	33	6	27			8	25		
III	27	4	23			5	22		

2.2 Vimentin 蛋白在各组中的分布情况

Vimentin 蛋白阳性定位于细胞质,呈棕黄色颗粒。Vimentin 蛋白在正常组中的阳性率为 6.7%(1/15),在 OSCC 组中的阳性率为 74.1%(63/85),OSCC

组与正常组对比,Vimentin 蛋白的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 20.71, P < 0.001$,图 2)。

Vimentin 蛋白的表达与临床分期、淋巴结转移等因素的差异有统计学意义($P < 0.05$),而与性



a: 正常组织中 Vimentin 蛋白阴性表达 ;b : OSCC 组中 Vimentin 蛋白阳性表达;→: 示阳性

图 2 Vimentin 蛋白在各组中的表达(免疫组化染色 × 200)

Figure 2 The expression of Vimentin in the OSCC and normal groups (Immunohistochemical staining × 200)

别、年龄、部位、组织学分化等因素的差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 1)。

2.3 各蛋白之间的相关性

在 OSCC 组中, Twist 蛋白与 Vimentin 蛋白存在显著正相关关系($r = 0.578, P < 0.05$)。

3 讨 论

Twist 是近来发现与肿瘤发生发展较密切相关的基因之一, 定位于人类染色体 7p21 上, 由 606 个碱基序列组成, 包含有 2 个外显子和 1 个内含子, 编码的氨基酸共 202 个, 由 N-端、碱性螺旋-环-螺旋、C-端三个区域组成, 通过分子中碱性螺旋-环-螺旋与 DNA 上的 E-box 结合形成同源或异源二聚体, 调节靶基因的表达, 对组织器官的形成及分化具有重要作用^[5]。Twist 作为一种转录因子, 可参与多个重要信号通路的调控, 从而促进肿瘤的发生和发展^[6-7]。本研究结果表明: 与正常组相比, Twist 蛋白在 OSCC 中表达显著上调, 并与临床分期、淋巴结转移等因素相关, 这与国内外学者的研究较为一致。Zhou 等^[8]报道 Twist 在 OSCC 中表达上调, 其表达与临床分期、淋巴结转移、远处转移和局部复发有关; 郑婧等^[9]也发现 Twist 在 OSCC 中表达上调, 其表达水平与淋巴结转移、临床分期有关。以上研究结果提示 Twist 蛋白在 OSCC 的发生和发展中起着重要的作用, 并可作为预测 OSCC 患者预后的一个独立因素。

EMT 主要在胚胎发育、组织修复中起重要作用,

最近的研究还表明许多具有转移性的恶性肿瘤中均存在有 EMT 现象。发生 EMT 的细胞失去原有的上皮细胞特性, 上皮标志物 E-钙黏蛋白表达下调, 同时出现间质细胞的特性, 间质细胞标志物 Vimentin 蛋白表达上调^[10]。本研究发现, 与正常组相比, 在 OSCC 中 Vimentin 表达上调, 并与临床分期、淋巴结转移等因素相关。国内外也有学者发现 E-钙黏蛋白在 OSCC 的细胞膜上的染色逐渐降低, 而 Vimentin 在胞浆内的表达逐渐升高^[11]。Imajyo 等^[12]在 OSCC 的临床标本中证实细胞 EMT 标志物的表达与局部淋巴结转移和远处相关。Dennis 等^[13]发现在头颈部肿瘤细胞系中上调 Snail 的表达后促进了细胞的 EMT 侵袭的能力增加。以上研究结果提示在 OSCC 的发生和发展中 EMT 发挥着重要的作用。

有研究表明在 OSCC 中 Twist 的表达可能与 EMT 相关, 但其研究多集中在探讨 Twist 和 E-cadherin 表达之间的关系, 结果表明 Twist 的表达与 E-cadherin 的表达呈负相关^[14], 而孙雅楠等^[15]在研究口腔黏膜异常增生不同阶段上皮细胞 Twist 启动子甲基化时, 发现 Twist 的甲基化率随口腔黏膜上皮异常增生程度的加重而升高, 但与 E-cadherin 的甲基化率无明显相关性。关于 Twist 和 Vimentin 在 OSCC 组织中关系的研究较少, 而在其它鳞癌组织中研究也不多, 多集中在食管鳞癌细胞, 结果表明 Twist 的表达与 Vimentin 呈正相关^[16]。在本研究中主要探讨 Twist 蛋白和 Vimentin 蛋白表达之间的关

系,结果发现在 OSCC 组织中 Twist 蛋白在细胞核中阳性表达较强时,相应的 Vimentin 蛋白在细胞浆是表达也较强,经 Spearman 等级相关分析显示, Twist 蛋白与 Vimentin 蛋白存在显著正相关关系。结合本课题和其他学者的研究结果,提示在 OSCC 中 Twist 蛋白的表达不仅与 E-cadherin 表达相关,而且与 Vimentin 蛋白表达相关。

本课题的研究结果表明在 OSCC 中 Twist 蛋白、Vimentin 蛋白表达增加,并且 Twist 蛋白与 Vimentin 蛋白的表达呈正相关,提示在 OSCC 的发生和发展中 Twist 蛋白发挥着重要的作用,其机制可能与促进肿瘤细胞的 EMT 有关,具体机制还有待进一步的深入研究。下一步将收集更多的正常口腔黏膜标本,检测 EMT 相关标志物包括 E-cadherin、N-cadherin 的表达情况,并通过调控 Twist 蛋白基因的表达,探讨其调控 EMT 的具体机制。

参考文献

- [1] Khan MA, Chen HC, Zhang D, et al. Twist: a molecular target in cancer therapeutics[J]. Tumour Biol, 2013, 34(5): 2497-2506.
- [2] Zou H, Feng X, Cao JG. Twist in hepatocellular carcinoma: pathophysiology and therapeutics[J]. Hepatol Int, 2015, 9(3): 399-405.
- [3] Li CW, Xia W, Lim SO, et al. AKT1 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer through Phosphorylation-dependent twist1 degradation[J]. Cancer Res, 2016, 76(6): 1451-1462.
- [4] 平金良, 顾栋桦, 徐炜, 等. 喉鳞状细胞癌组织 Twist 表达与上皮-间质转化相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(18): 1451-1455.
- [5] Ozdemir A, Fisher-Aylor KI, Pepke S, et al. High resolution mapping of Twist to DNA in drosophila embryos: efficient functional analysis and evolutionary conservation[J]. Genome Res, 2011, 21(4): 566-577.
- [6] Cheng GZ, Chan J, Wang Q, et al. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel[J]. Cancer Res, 2007, 67(5): 1979-1987.
- [7] Uthaya Kumar DB, Chen CL, Liu JC, et al. TLR4 signaling via NANOG cooperates with STAT3 to activate twist1 and promote formation of tumor-initiating stem-like cells in livers of mice[J]. Gastroenterology, 2016, 150(3): 707-719.
- [8] Zhou Y, Zhang H, Zhuo X, et al. Over-expression of TWIST, an epithelial-mesenchymal transition inducer, predicts poor survival in patients with oral carcinoma[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(6): 9239-9247.
- [9] 郑靖, 南欣荣. Twist 蛋白在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. 中国医药指南, 2012, 10(24): 212-213.
- [10] Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, et al. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome[J]. Mod Pathol, 2010, 23(2): 213-224.
- [11] Chaw SY, Abdul Majeed A, Dalley AJ, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers - E-cadherin, beta-catenin, APC and vimentin - in oral squamous cell carcinogenesis and transformation[J]. Oral Oncol, 2012, 48(10): 997-1006.
- [12] Imaiyo I, Sugiura T, Kobayashi Y, et al. T-box transcription factor Brachyury expression is correlated with epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2012, 41(6): 1985-1995.
- [13] Dennis M, Wang G, Luo J, et al. Snail controls the mesenchymal phenotype and drives erlotinib resistance in oral epithelial and head and neck squamous cell carcinoma cells[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2012, 147(4): 726-732.
- [14] De Freitas Silva BS, Yamamoto-Silva FP, Pontes HA, et al. E-cadherin downregulation and Twist overexpression since early stages of oral carcinogenesis[J]. J Oral Pathol Med, 2014, 43(2): 125-131.
- [15] 孙雅楠, 余文婷, 薛敬玲, 等. 口腔黏膜异常增生不同阶段上皮细胞 E-cadherin, Twist1 启动子甲基化研究[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2016, 37(5): 689-693.
- [16] Gao Y, Xuan XY, Zhang HY, et al. Relationship between TWIST expression and epithelial-mesenchymal transition of oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Cell Biol Int, 2012, 36(6): 571-577.

(编辑 罗燕鸿, 刘曙光)