

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.08.013

Twist1 调控 FoxM1 在上皮性卵巢癌中的表达 *

杨丽娜^{1,3} 赵 静¹ 吴 娟¹ 李 郁² 杨 红^{1△}

(1 第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032;

2 第四军医大学基础部细胞生物学教研室 陕西 西安 710032 ; 3 中国兵器工业卫生研究所 陕西 西安 710065)

摘要 目的:探讨 Twist1 调控转录因子 FoxM1 在上皮性卵巢癌中的表达。**方法:**采用免疫组织化学 SP 法检测 FoxM1、Twist1 在上皮性卵巢癌组织中表达情况,斯皮尔曼秩相关分析其在上皮性卵巢癌组织中的表达相关性;双荧光素酶报告系统检测 Twist1 对 FoxM1 的调控作用;Real-time quantitative RT-PCR 和蛋白免疫印迹技术验证 Twist1 对 FoxM1 的调控作用。**结果:**Twist1、FoxM1 在上皮性卵巢癌组织中的阳性表达率分别是 71.4 % (40/56)、78.6 % (44/56),明显高于正常卵巢组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);且其在上皮性卵巢癌中的表达显著相关($r = 0.896$, $P < 0.01$);Twist1 可以结合并激活 FoxM1 启动子($P < 0.05$);上调 Twist1 表达可以激活 FoxM1 在卵巢癌细胞中的表达($P < 0.05$),而干扰 Twist1 后可以下调 FoxM1 的表达($P < 0.05$)。**结论:**Twist1 参与调控增殖相关转录因子 FoxM1 在卵巢癌中的表达,可能是一个潜在的治疗靶点。

关键词: Twist1; FoxM1; 上皮性卵巢癌; 表达调控

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)08-1452-05

Twist1 Regulates the Expression of FoxM1 in Epithelial Ovarian Cancer*

YANG Li-na^{1,3}, ZHAO Jing¹, WU Juan¹, LI Yu², YANG Hong^{1△}

(1 Department of obstetrics and gynaecology, Xi Jing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Institute of Health For Ordnance Industries, Xi'an, Shaanxi, 710065, China)

ABSTRACT Objective: This study aims to explore that Twist1 regulates the expression of transcription factor FoxM1 in human epithelial ovarian cancer. **Methods:** Immunohistochemical staining (SP) was used to evaluate the expression levels of FoxM1 and Twist1 in human ovarian cancer, Spearman's rho was calculated to analyze the correlation between FoxM1 expression and Twist1 expression. Dual-luciferase reporter assay system was employed to test the effect of Twist1 on the expression of FoxM1. Real-time quantitative RT-PCR and Western-blot were exerted to validate regulatory effect of Twist1 on FoxM1. **Results:** The positive expression rates of Twist1 and FoxM1 in epithelial ovarian cancer were 71.4% (40/56) and 78.6% (44/56), respectively, which were remarkably higher than those in normal ovarian tissues. The difference was statistically significant ($P < 0.01$). FoxM1 had a significant positive correlation with the expression of Twist1 in these epithelial ovarian cancer samples ($r = 0.896$, $P < 0.01$). Twist1 was involved in activation of the FoxM1 promoter ($P < 0.05$). Up regulation of Twist1 can activate expression of FoxM1 in epithelial ovarian cancer ($P < 0.05$), and the expression of FoxM1 was decreased significantly when the expression of Twist1 was downregulated ($P < 0.05$). **Conclusions:** Twist1 may be involved in regulation of expression of proliferation-associated transcription factor FoxM1 in human ovarian carcinoma and may serve as a promising therapeutic target for ovarian cancer.

Key words: Twist1; FoxM1; Human epithelial ovarian cancer; Expression and regulation

Chinese Library Classification (CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)08-1452-05

前言

在女性生殖系统恶性肿瘤中,卵巢癌的发病率仅次于宫颈癌,位居第二,但死亡率却居首位,已经成为严重威胁妇女生命健康的恶性疾病之一,根据美国癌症协会最新统计数据,2013 年大约有 22,240 新发卵巢癌病例,同年 14,030 名患者死于该疾病^[1]。它具有起病隐匿、易转移、复发率高、预后差等特

点。虽然在过去的几十年里对卵巢癌的研究取得了较大的进展,但卵巢癌病人的 5 年生存率仍然较低,仅为 25 % ~ 35 %,因此探明卵巢癌的确切发病机制以及探寻影响其侵袭、转移的分子机制,寻找新的诊治靶点,为临床探索有效的治疗方案提供有利依据显得尤为迫切。Twist 属于螺旋 - 环 - 螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 蛋白家族,它既是一种癌基因蛋白,又是一种高度保守的可以调控上皮间质化 (epithelial-mesenchy-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272202)

作者简介:杨丽娜(1981-),女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:妇科肿瘤, E-mail: yalina258@126.com

△ 通讯作者:杨红,女,博士,主任医师,主要研究方向:妇科肿瘤, E-mail: 1966744973@qq.com

(收稿日期:2014-09-16 接受日期:2014-10-10)

mal transition, EMT)的重要转录因子,与细胞凋亡、多种恶性肿瘤的形成、侵袭、转移有密切关系^[2,3]。其家族主要包括 Twist1 和 Twist2 两种基因, Twist1 分布较广泛,故本文以它为主要研究对象。叉头框蛋白 M1(FoxM1)是一种典型的增殖相关转录因子,可以刺激细胞增殖并推进细胞周期进程(促使细胞从 G1 期进入 S 期, G2 其进入 M 期)。研究发现 FoxM1 在多种肿瘤细胞中表达上调,并且可以促进肿瘤细胞的增殖,侵袭和转移^[46],它有一个称为叉头框的 DNA 结合结构域^[7],并因此得名。转录因子调控基因表达是许多生物过程和癌变进行的重要因素之一^[8], FoxM1 的转录调控也成为近年来的研究热点之一,本研究首次在卵巢癌细胞中发现 Twist1 参与调控 FoxM1 的表达,并通过调控 FoxM1,促进卵巢癌细胞的恶性生物学行为。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Twist1 真核表达载体、FoxM1 启动子真核表达载体、Twist1-siRNA (以上均由第四军医大学细胞工程中心馈赠), RPMI-1640 培养基(北京 Hyclon), 新生胎牛血清(北京 Hyclon), 鼠抗人 FoxM1 单抗、兔抗人 β -actin 单抗、兔抗人 Twist1 单抗(均购自英国 Abcam 公司), 羊抗鼠、兔 IgG 红外二抗及 PVDF 膜(第四军医大学微生物实验室馈赠), RNA 提取试剂盒(AxyGen Bioscience), primeScript RT reagent Kit Perfect Real Time (大连 TaKaRa), SYBR@Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)(大连 TaKaRa), RIPA 蛋白裂解液(西安沃尔森生物技术有限公司), SP 免疫组织化学染色试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术公司, 引物合成(北京奥科)。

1.2 方法

1.2.1 卵巢癌组织的收集 选自第四军医大学 2011 年 4 月~2013 年 10 月之间行手术切除并经病理证实为上皮性卵巢癌组织及正常卵巢组织标本所制蜡块, 其中上皮性卵巢癌 56 例, 正常卵巢组织 30 例。所有卵巢癌病例均为原发性卵巢癌病例, 术前未接受放化疗、未服用激素类药物, 30 例正常卵巢组织来自卵巢活检病例和因子宫肌瘤、功能性子宫出血或子宫脱垂行全子宫切除同时行卵巢切除病例, 病理证实卵巢组织无异常。

1.2.2 免疫组织化学染色及结果判读 采用免疫组化 SP 法, 染色步骤严格按照试剂盒说明书进行, 石蜡切片常规脱蜡, PBS 冲洗, 高温高压抗原修复, 加 Twist1、FoxM1 工作液 4℃ 过夜, DAB 显色, 苏木精复染, 中性树脂胶封固。PBS 代替一抗作为阴性对照, 已知阳性结果做阳性对照。结果显示: FoxM1 的表达产物均主要定位于胞核, Twist1 主要表达于细胞浆。半定量积分法判定结果: 光镜下, 以胞质或胞核出现棕色或棕褐色颗粒作为阳性结果, 由 2 名病理医师进行独立双盲评分。每张切片随机选取 5 个 400 倍光学显微镜下视野, 将所选取视野中阳性细胞的染色范围及染色强度依据以下标准进行半定量, 最终结果取平均值。具体标准为: (1) 染色范围计分: 将阳性细胞数占总细胞数的比率按照 <1%, 1%~10%, 11%~26%, 26%~50%, 51%~75%, >75% 分别记为 0、1、2、3、4、5 分; (2) 染色强度分: 按照未染色、浅黄色、棕黄色、棕褐色分别记为 0、1、2、3 分。两者乘积为该切片积分, 在 0 到 15 之间, 大于 5 认为是阳性染色。

1.2.3 细胞来源及培养 该实验所采用人卵巢癌细胞株 A2780 细胞系(第四军医大学细胞工程中心馈赠), HEK-293T (第四军医大学微生物实验室馈赠, 该细胞用于细胞转染及荧光素酶报告基因检测)。所用卵巢癌细胞按 37℃ 5% CO₂ 培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青链霉素的 RPMI-1640 培养基中。HEK-293T 所用培养基为含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青链霉素的 DMEM 高糖培养基, 培养条件同上。转染前一天将细胞接种于 6 孔板(1×10⁶ 细胞/孔), 培养条件不变, 待细胞贴壁良好, 生长状态最佳时进行转染。

1.2.4 质粒转染及荧光素酶报告基因分析 将 FoxM1 启动子真核表达载体 pGL3-Basic-FoxM1p(-400~-240)转染 HEK-293 细胞, 同时共转染不同剂量的 Twist1 真核表达载体(0、0.5、1.0、2.0 μ g), PRL-TK 为内对照。转染 48 h 后检测报告基因的表达水平, 检测方法参照试剂使用说明书。计算萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值即为报告基因的相对活性, 每组实验重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.5 RNA 干扰及 Real-time quantitative RT-PCR 所用 Twist1 分子特异性 siRNA 序列如下: Twist1-siRNA 序列正义链为 5'-CCUCUGCAUUCUGAUAGAA dTdT-3'; 反义链为 5'-UUCUAUCAGAAUGCAGAGG TdT-3'。阴性对照 siRNA 为购自 Ambion 公司的 negative control siRNA (SNC)。将 8 μ L (20 μ M) siRNA, 8 μ L lip2000 分别溶于 200 μ L 双无 RPMI1640 培养基中, 室温孵育 5 min, 轻柔混合后, 室温孵育 20 min; 吸除细胞培养液, 以无血清培养基轻洗细胞 2 次, 每孔加入培养液 2 mL, 将孵育后的混合物加入相应 6 孔板内, 37℃, 5% CO₂ 培养 6h, 更换血清培养液, 继续培养 48 h。总 RNA 试剂盒抽提各组卵巢癌细胞的 RNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA 提取质量, 反转录后以 cDNA 为模板, 利用荧光定量 PCR 仪扩增目的基因, 检测 Twist1、FoxM1 的表达。反应条件: 95℃ 预变性 10 min; 94℃ 变性 1 min; 60℃ 复性 30 s; 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环后进一步 72℃ 延伸 10 min, 每个反应做 3 个复孔试验。反应体系 25 μ L, RT-PCR 所用引物如下: FoxM1 上游 5'-CACCCAGTGCCAACCGCTACTTG-3', 下游 5'-AAAGAGGAGCTATCCCCTCCTCAG-3'; Twist1 上游 5'-CGGACAAGCT GAGCAAGATT-3', 下游 5'-CCTTCTCTGGAAACAATGAC-3'; GAPDH 上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCA C-3', 下游 5'-TC CACCACCCTGTTGCTGTA-3'。

1.2.6 质粒转染及蛋白免疫印迹分析 在卵巢癌 A2780 细胞中分别转染 Twist1/pcDNA3.1(+), Twist1-siRNA, 其中空细胞组为阴性对照组。RIPA 裂解细胞提取总蛋白。BCA 法蛋白定量, 根据需要配胶。取蛋白样品 40 μ L (约 10 μ g) 上样, 稳压 80V 电泳 30 min; 稳压 100V 电泳 1 h; 100V 湿转 50 min; 5% BSA 室温摇床上封闭 1 h; 一抗孵育(鼠抗 FoxM1 稀释比例为 1:100, 兔抗 Twist1 稀释比例为 1:500, 兔抗 β -actin 稀释比例为 1:1000), 4℃ 摇床过夜。TBST 漂洗, 20 min×3 次; 二抗室温孵育 1 h; 双色红外激光扫描成像系统扫描成像。

1.3 统计学分析

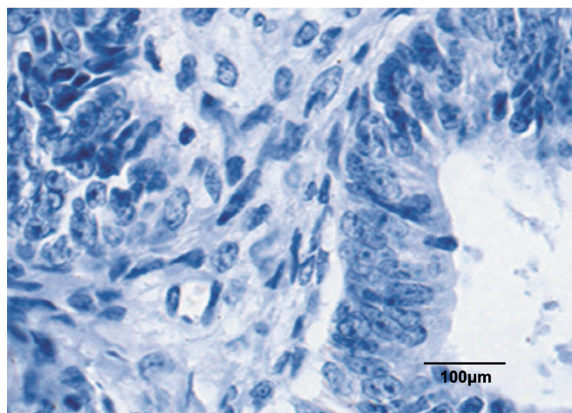
每个实验都至少重复两次, 其中将具有代表性的实验结果列出。所有的统计都经由 SPSS19.0 统计软件完成, 均为双侧检

验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。Spearman's rho 秩相关分析 Twist1 与 FoxM1 的表达相关性。

2 结果

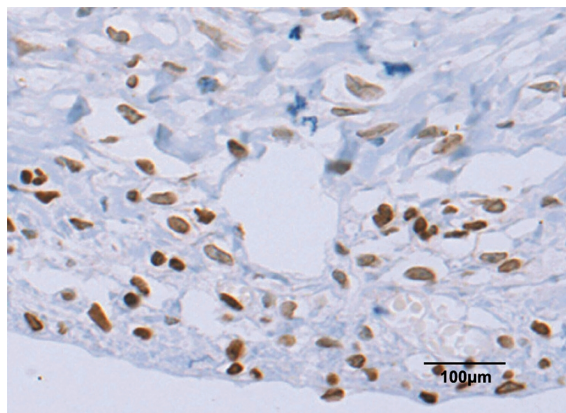
2.1 FoxM1、Twist1 高表达于卵巢癌组织

FoxM1 在上皮性卵巢癌组织中的阳性表达率 (44/56 ≈ 78.6%) 明显高于正常卵巢组织 (4/30 ≈ 13.3%), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。Twist1 在卵巢癌组织中的阳性表达率 (40/56 ≈ 71.4%), 高于正常卵巢组织 (5/30 ≈ 16.7%), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



(a) 正常卵巢组阴性表达 (400×)

(a) negative expressions in normal tissues (400×)

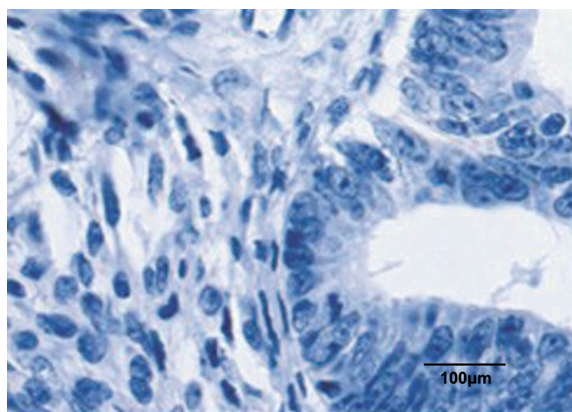


(b) 卵巢癌组织阳性表达 (400×)

(b) Positive expressions in ovarian cancer tissues (400×)

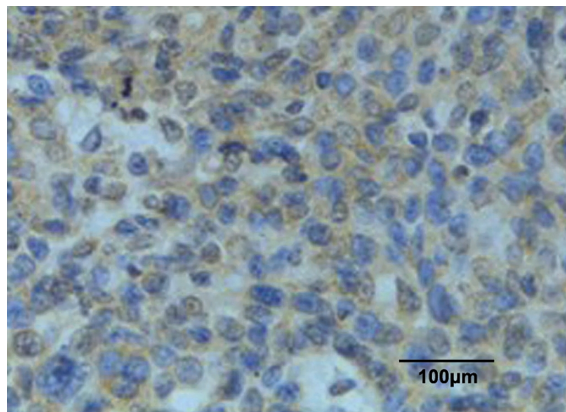
图 1 FoxM1 在正常卵巢和卵巢癌组织中的免疫组化染色结果

Fig.1 The expressions of FoxM1 detected by immunohistochemical staining analysis in normal ovarian and ovarian cancer tissues



(a) 正常卵巢组阴性表达 (400×)

(a) negative expressions in normal tissues (400×)



(b) 卵巢癌组阳性表达 (400×)

(b) Positive expressions in ovarian cancer tissues (400×)

图 2 Twist1 在正常卵巢和卵巢癌组织中的免疫组化染色结果

Fig.2 The expressions of Twist1 detected by immunohistochemical staining analysis in normal ovarian and ovarian cancer tissues

2.2 Twist1 与 FoxM1 在卵巢癌组织中的表达呈显著相关

Twist1、FoxM1 在上皮性卵巢癌中的表达呈显著相关 ($r = 0.896, P < 0.01$), 见图 3。

2.3 Twist1 参与调节 FoxM1 的表达

Real-time quantitative RT-PCR 和蛋白免疫印迹结果提示在卵巢癌 A2780 细胞系中转染 Twist1 真核载体质粒后, FoxM1 的 mRNA (见图 4a) 和蛋白 (见图 5a) 表达明显增加, 而在转染 Twist1 的 siRNA 后 FoxM1 的 mRNA (见图 4b) 和蛋白 (见图 5b) 表达明显下降。

2.4 Twist1 激活 FoxM1 启动子

双荧光素酶报告分析显示随着 Twist1 质粒用量的增加,

FoxM1 启动子区的活性逐渐增强, 见图 6。

3 讨论

Twist 基因最初在果蝇的胚胎发育研究中发现, 可调节细胞移动和组织重建, 诱导中胚层发育。目前研究证实 Twist 在多种人类上皮来源肿瘤中高表达^[9,10], 与上皮间质转化现象及肿瘤转移密切相关, 是上皮间质转化过程的关键调控因子^[11], 在肝癌细胞中过表达 Twist 可促进癌细胞的增殖、侵袭、转移能力^[12]。Hosono 等^[13]研究发现, Twist 与卵巢癌复发、转移及不良预后相关。本研究结果表明, Twist 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的阳性表达率显著高于正常卵巢组织, 提示 Twist 在上皮性卵巢癌的

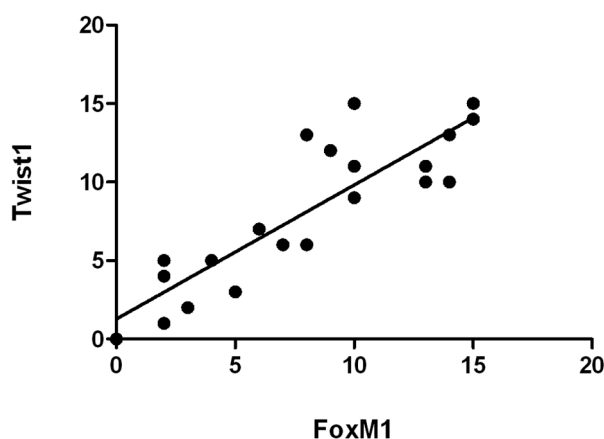


图3 Twist1 与 FoxM1 在卵巢癌组织中的表达相关性曲线(单位:分)

Fig.3 Correlation between Twist1 expression and FoxM1 expression in epithelial ovarian cancer(Unit: score)

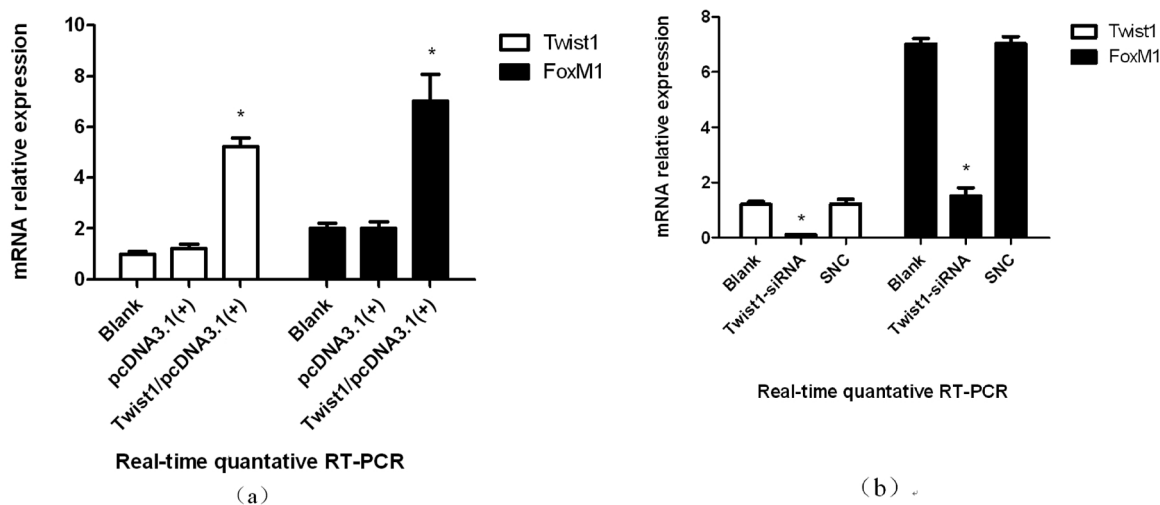


图4 上调(a)或干扰(b)Twist1 表达对 FoxM1 在卵巢癌 A2780 细胞中 mRNA 表达水平的影响

Fig.4 The mRNA expression levels of FoxM1 effected by upregulation(a) or intervention(b) of Twist1 expression

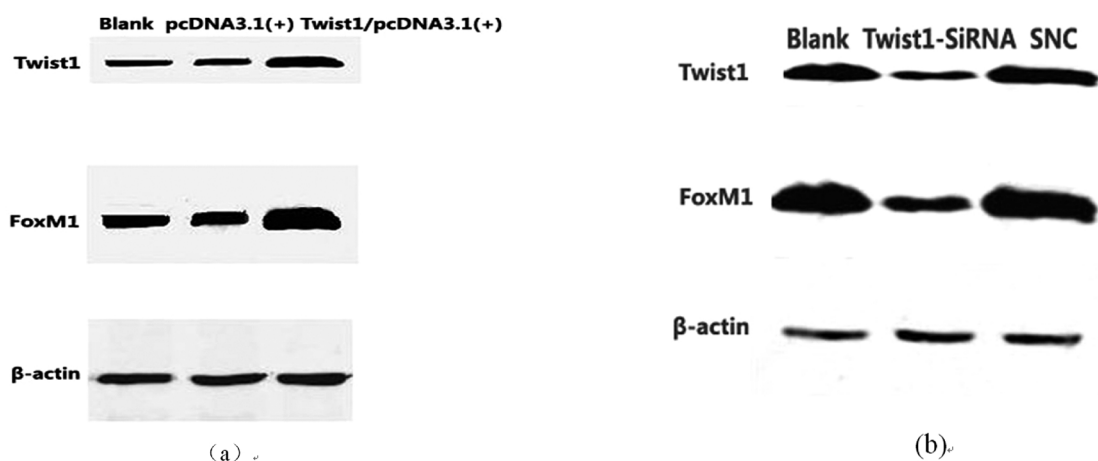


图5 Western-Blot 检测上调(a)或干扰(b)Twist1 表达对 FoxM1 蛋白表达的影响

Fig.5 The protein expression levels of FoxM1 effected by upregulation(a) or intervention(b) of Twist1 expression

发生、发展及侵袭、转移中起作用。

FoxM1 是一种原癌基因, 促进癌变并参与肿瘤的发生发展, 包括肿瘤血管生成, 迁移, 侵袭, 上皮间质转化, 转移, 肿瘤相关巨噬细胞的招募及化疗耐药等, 它的表达受到许多信号以及原癌基因和抑癌基因的影响, 既往研究发现, FoxM1 在非小

细胞肺癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、前列腺癌等多种癌症组织中呈过度表达^[14-16], 这一点在本研究的免疫组化结果中也得以证实。Kambach 等^[17]在乳腺癌癌中发现 ErB2 基因对 FoxM1 具有调控作用, Qian^[18] 等研究发现, Twist1 在转录水平通过招募 P300 直接上调 FoxM1 表达, 通过影响细胞周期调节因子如

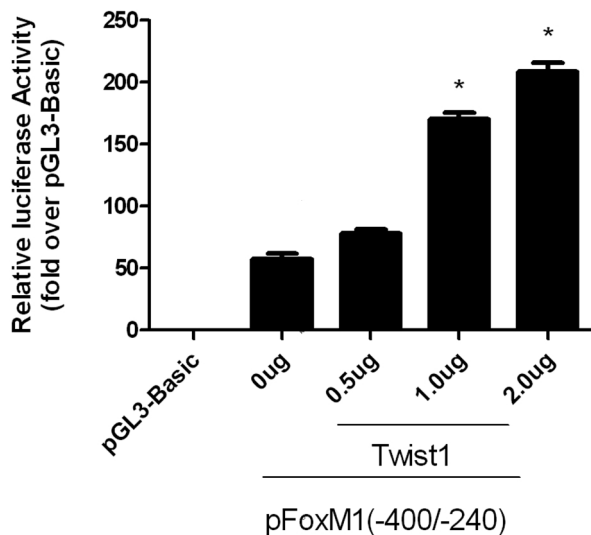


图6 双荧光素酶报告系统检测 Twist1 对 FoxM1 基因的转录激活作用
Fig.6 The Twist1 activation on the promoter of FoxM1 gene detected by Dual-luciferase reporter assay system

CDK 抑制因子 p21Cip1、p27Kip2、CDK 调节因子 CyclinB1、CyclinD2、CyclinE,促进胃癌细胞增殖能力,Xia^[19]等在对肝癌细胞的研究发现,TNF- α 通过诱导 HIF-1 与 FOXM1 启动子结合并表达,促进 HCC 增殖,增强其抗凋亡能力。Jiang^[20]等在卵巢癌中发现紫花牡荆素 (Casticin,CAS) 激活 FOXO3a 后导致 FoxM1 的表达下降从而促进卵巢癌细胞的凋亡。正确解读 FoxM1 的表达与调控机制对肿瘤治疗、预防的研究具有重要意义,已经成为目前癌症研究的热点之一。

本研究首次在上皮性卵巢癌细胞和组织中发现了 Twist1 与 FoxM1 的表达具有显著相关性。在卵巢癌细胞系中验证了 Twist1 可以上调转录因子 FoxM1 的表达^[18]。双荧光素酶报告系统检测证实 Twist1 可以结合并激活 FoxM1 转录启动子,揭示在 FoxM1 的表达过程中 Twist1 扮演着重要角色。Real-time quantitative RT-PCR 和 Western-blot 技术分别在基因及蛋白水平进一步验证了 Twist1 在卵巢癌细胞株 A2780 中上调 FoxM1 的表达。Twist1 调控 FoxM1 分子机制的研究对于我们制定新型靶向个体化诊疗方案、抑制卵巢癌的发生发展、提高卵巢癌的生存率及生存质量具有重要意义。

参考文献(References)

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013, 63(1): 11-30
[2] Cheng GZ, Zhang W, Wang LH. Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by Twist: AKT2 comes to interplay[J]. Cancer Res, 2008, 68(4): 957-960
[3] Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis[J]. Cell, 2004, 118(3): 277-279
[4] Raychaudhuri P, Park HJ. FoxM1: a master regulator of tumor metastasis[J]. Cancer Res, 2011, 71(13): 4329-4333

[5] Wierstra I, Alves J. FOXM1, a typical proliferation-associated transcription factor[J]. BiolChem, 2007, 388(12): 1257-1274
[6] Koo CY, Muir KW, Lam EW. FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment [J]. BiochimBiophysActa, 2012, 1819(1): 28-37
[7] Hannenhalli S, Kaestner KH. The evolution of Fox genes and their role in development and disease[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(4): 233-240
[8] Dynan WS, Tjian R. Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II[J]. Cell, 1983, 32(3): 669-680
[9] Wallerand H, Robert G, Pastieir G, et al. The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers [J]. UrolOncol, 2010, 28(5): 473-479
[10] Yu L, Lu S, Tian J, et al. TWIST expression in hypopharyngeal cancer and the mechanism of TWIST-induced promotion of metastasis [J]. Oncol Rep, 2012, 27(2): 416-422
[11] Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis[J]. Cell, 2004, 118(3): 277-279
[12] Ru GQ, Wang HJ, Xu WJ, et al. Upregulation of Twist in gastric carcinoma associated with tumor invasion and poor prognosis [J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(2): 341-347
[13] Hosono S, Kajiyama H, Terauchi M, et al. Expression of Twist increases the risk for recurrence and for poor survival in epithelial ovarian carcinoma patients[J]. Br J Cancer, 2007, 96(2): 314-320
[14] Xu N, Jia D, Chen W, et al. FoxM1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer patients through promoting tumor metastasis[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59412
[15] Kong X, Li L, Li Z, et al. Dysregulated expression of FOXM1 isoforms drives progression of pancreatic Cancer [J]. Cancer Res, 2013, 73(13): 3987-3996
[16] Li X, Qi W, Yao R, et al. Overexpressed transcription factor FOXM1 is a potential diagnostic and adverse prognostic factor in postoperative gastric cancer patients[J]. ClinTranslOncol, 2014, 16(3): 307-314
[17] Kambach DM, Sodi VL, Lelkes PI, et al. ErbB2, FoxM1 and 14-3-3zeta prime breast cancer cells for invasion in response to ionizing radiation[J]. Oncogene, 2014, 33(5): 589-598
[18] Qian J, Luo Y, Gu X, et al. Twist1 promotes gastric cancer cell proliferation through up-regulation of FoxM1[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77625
[19] Xia L, Mo P, Huang W, et al. The TNF- α /ROS/HIF-1-induced upregulation of FoxM1 expression promotes HCC proliferation and resistance to apoptosis[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(11): 2250-2259
[20] Jiang L, Cao XC, Cao JG, et al. Casticin induces ovarian cancer cell apoptosis by repressing FoxM1 through the activation of FOXO3a[J]. OncolLett, 2013, 5(5): 1605-1610