

研究报告

Twist 对小鼠乳腺癌细胞基因表达谱的调控研究

杨 静 顾玉超 于文功**

(中国海洋大学医药学院 青岛 266003)

摘要 Twist 是一个 bHLH(basic Helix-loop-Helix) 类型的转录因子, 近年来研究发现, Twist 在乳腺癌中的表达显著升高, 并能促进乳腺癌的转移。为了探索 Twist 促进乳腺癌转移的分子机制, 采用 RNA 干扰技术在小鼠乳腺癌细胞株 4T1 中沉默 Twist 的表达, 通过全基因组基因芯片技术检测了 Twist 沉默前后 4T1 细胞基因表达谱的差异性。体内实验结果证明 Twist 表达被沉默后 4T1 细胞的肺转移能力明显被抑制。芯片结果表明: 表达差异显著的基因有 167 条, 其中与肿瘤相关的基因有 26 条, 包括 15 条上调基因和 11 条下调基因。这些基因中可能存在能被 Twist 调控并与肿瘤转移相关的基因, 为以后研究 Twist 影响乳腺癌转移的分子机制提供了帮助。

关键词 Twist 乳腺癌 肿瘤转移 基因表达谱

中图分类号 Q786

Twist 蛋白是一个 bHLH(basic Helix-loop-Helix) 类型的转录因子, 在小鼠和人类中其氨基酸序列具有 96% 的同源性, 并且在不同的种属中其 DNA 结合区域具有 100% 的序列保守, 都能结合一种 E-box 的 DNA 序列: CANNTG。同其它转录因子一样, Twist 能在转录水平上调许多基因的表达^[1~4]。Twist 生物学功能的最初发现是在胚胎发育过程中通过促进表皮-间叶细胞转换(EMT)来调节胚胎的发育^[5,6]。而 EMT 是一个失去上皮细胞极性、细胞与细胞接触能力, 并且重塑细胞骨架的过程, 在许多肿瘤的进展中起重要的作用。目前研究发现 Twist 能影响肿瘤细胞的凋亡, 对许多肿瘤的侵袭和转移都有重要影响^[7~10], 在乳腺癌中也发现 Twist 发生异常表达并在乳腺癌的转移过程中发挥重要的作用^[11,12]。已有报道在高度转移性的小鼠乳腺癌细胞中抑制 Twist 表达, 可以特异性阻止癌细胞从乳腺到肺部的转移和血管内渗; 在人的乳腺癌细胞中也发现 Twist 能通过抑制 E-cadherin 的表达来促进 EMT 从而促进肿瘤的迁移和侵袭^[4,11]。

尽管目前 Twist 已经被确认是一种癌蛋白, 但是 Twist 究竟是通过调节哪些基因的表达从而影响癌症发生发展的机制却不完全清楚。为了研究其具体机制, 本文建立了 Twist 沉默细胞模型, 然后利用全基因组芯片技术来检测差异基因, 希望能从这些差异基因中发现被 Twist 调控在肿瘤转移过程中发挥作用的靶基因。

1 材料与方法

1.1 细胞与培养基

小鼠乳腺癌细胞株 4T1 为美国 Karmanos Cancer Insitute 的 Fred R. Miller 教授提供。4T1 细胞可以在肺形成转移灶, 并且有肝转移和骨转移能力。人的逆转录病毒包装细胞株 Phoenix A 细胞为本实验室保存。细胞培养用培养基为 DME-10 培养基; DMEM (GIBCO), 含 10% 胎牛血清和 1% 非必需氨基酸。

1.2 仪器及试剂

7500 实时荧光定量 PCR 系统(Applied Biosystems, Singapore)。反转录 PCR 所用试剂为: 高容量 cDNA 反转录试剂盒(Applied Biosystems, Warrington, UK)。定量 PCR 所用试剂为: SYBR-Green Master PCR mix (Applied Biosystems, Warrington, UK)。

收稿日期: 2007-12-11 修回日期: 2008-01-10

* 国家“973”计划资助项目(2003CB716402)

**通讯作者, 电子信箱: yuwg66@ouc.edu.cn

1.3 干扰细胞株的构建

慢病毒载体 PSP108 及小鼠 Twist 干扰载体:PSP108-siTwist3, PSP108-siTwist5 为英国 Whitehead Institute 的 Robert A. Weinberg 教授惠赠。PSP108, PSP108-siTwist3 和 PSP108-siTwist5 分别用磷酸钙法转染 Phoenix A 细胞, 48h 后收集含有病毒颗粒的培养基上清来感染 4T1 细胞, 感染 48h 后, 在含有 4 μ g/ml 嘌呤霉素的培养基中筛选 2 周, 从而得到稳定感染细胞株: 4T1-siTwist3, 4T1-siTwist5 和对照细胞株 4T1-Control。

1.4 细胞总 RNA 的提取, 反转录 PCR 及 SYBR-Green Real-Time PCR

用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度计定量, 检测纯度。反转录按照反转录试剂盒步骤进行。

SYBR-Green Real-Time PCR 所用引物: 小鼠 GAPDH 上游引物序列: 5'-AATTCACGGCACAGTCAAGG-3', 下游引物序列: 5'-TGTTAGTGGGTCTCGCTCC-3'。小鼠 Twist 上游引物序列: 5'-TACGCCTTCTCCGCTGG-3', 下游引物序列: 5'-CTAGTGGGACGCGGAC-3'。用小鼠 GAPDH 基因作为内参, 目的基因相对定量比值为 $2^{-(\text{Ct}-\text{Ct}_0)}$ 。

1.5 体内肺转移试验

实验用 8~10 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 先用戊巴比妥钠 (50 mg/kg 体重) 麻醉, 然后 4T1-Control, 4T1-siTwist3 和 4T1-siTwist5 细胞在指数增长期时消化下来, 用 PBS 充分清洗后用 DME-10 培养基重悬。每只小鼠的第 5 对乳腺各种入 5×10^5 个细胞 (10 μ l DME-10)。大约 4 周后, 处死取原位瘤称重, 取肺观察上面转移结节数, 并作统计学分析。体内实验共重复 3 次, 结果相似。

1.6 基因芯片分析

1.6.1 芯片的制备 芯片共有 35825 条 70 mer 长度的 Oligo DNA, 来源于 Qiagen 公司 Oligo 库 Mouse Genome Version 4.0, 代表约 25000 个基因, 38000 个转录本。用 SmartArrayerTM 点样仪点制在一张 75 \times 25 mm, 经过化学修饰的载玻片上。60 $^{\circ}$ C 水浴锅上水合 10 s, 室温干燥, UV 交联, 0.5 % SDS, 蒸馏水, 乙醇清洗处理, 晾干备用。

1.6.2 探针的标记 采用双通道荧光交换 (Cy5 和 Cy3), 逆转录合成及纯化 cDNA 探针, 用 Cy3-dCTP 标记对照细胞 cDNA, 用 Cy5-dCTP 标记 Twist 沉默细胞 cDNA。本实验还进行了 1 次反标。

1.6.3 杂交与清洗 标记的 DNA 溶于 30 μ l 杂交液中 (3 \times SSC, 0.2 % SDS, 5 \times Denhart's, 25 % 甲酰胺), 于 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交结束后, 先在 42 $^{\circ}$ C 左右含 0.2 % SDS, 2 \times SSC 的液体中洗 5min, 而后在 0.2 \times SSC 中室温洗 5min, 玻片甩干后即可用于扫描。按同样的程序将反标的探针与另一平行的基片进行杂交。

1.6.4 芯片的扫描和数据的读取分析 用 LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪 (CapitalBio 公司) 获取原始信号, 采用 GenePix Pro 4.0 图像分析软件 (Axon Instruments 公司) 对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号; 然后对芯片上的数据用 Lowess 方法进行归一化; 最后以差异为 1.5 倍的标准来确定差异表达基因。芯片制作和数据采集由北京博奥生物芯片有限责任公司协助完成。

2 结果

2.1 Twist 沉默细胞株的构建

通过病毒感染, 将病毒载体 PSP108, PSP108-siTwist3 和 PSP108-siTwist5 导入 4T1 细胞, 筛选得到稳定表达细胞株 4T1-control, 4T1-siTwist3 和 4T1-siTwist5。定量 PCR 结果表明, Twist 沉默细胞株 mRNA 水平被有效地抑制 (图 1)。

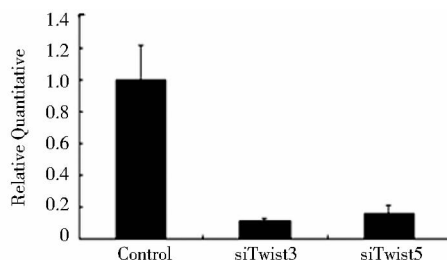


图 1 定量 PCR 检测 4T1-Control, 4T1-siTwist3 和 4T1-siTwist5 细胞中 Twist 的表达量

Fig. 1 Quantitative PCR analysis of Twist mRNA expression in 4T1-Control, 4T1-siTwist3 and 4T1-siTwist5 cells

2.2 Twist 沉默能抑制乳腺癌细胞的肺转移能力

为了验证 Twist 的表达被抑制后对 4T1 细胞转移能力的影响, 我们通过体内实验检测了 4T1-Control 和 4T1-siTwist3 细胞株的肺转移能力。结果表明, Twist 的表达沉默能有效抑制 4T1 细胞的肺转移能力 (图 2)。

2.3 全基因组芯片分析

为了寻找 Twist 调控的下游基因和探讨 Twist 在肿瘤转移中的作用机制, 我们通过小鼠全基因组芯片检

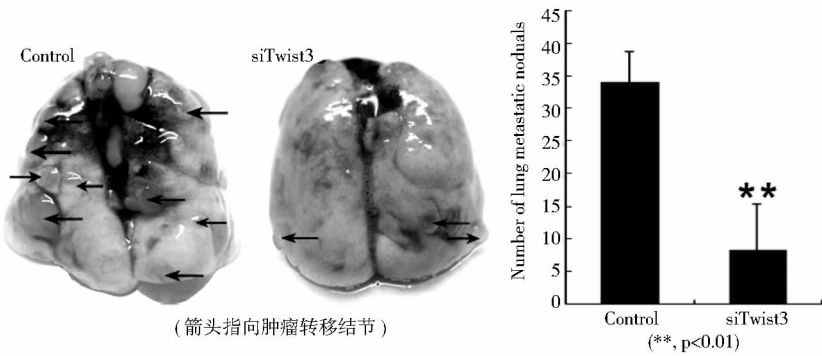


图 2 Twist 表达沉默显著抑制 4T1 细胞的肺转移能力

Fig.2 Silencing of twist significantly suppressed lung metastasis of 4T1 cells

测了 4T1-Control 和 4T1-siTwist3 细胞株的基因表达谱。芯片共检测了 25000 个基因,38000 个转录本,以两张芯片结果均相差 1.5 倍以上的基因作为候选基因,共发现 81 个下调基因和 86 个上调基因,其中与肿瘤相关

的基因共有 26 个。对肿瘤发生发展有抑制作用的基因有 9 个被上调,3 个被下调;对肿瘤发生发展有促进作用的基因有 8 个被下调,6 个被上调(表 1)。

表 1 Twist 沉默细胞株与正常细胞株间差异表达的基因

Table 1 The genes differentially expressed between 4T1-Control and 4T1-siTwist3 cells

编号	基因库序号	基因名称	基因功能	Cy5/Cy3
上调基因(对肿瘤发生有抑制作用的基因)				
1	NM_008338	interferon gamma receptor 2 (Ifngr2)	抑制肿瘤细胞增生,血管生成	2.2899
2	NM_011594	inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2)	抑制增殖,血管生成,MMP2 活性	1.9915
3	NM_009400	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18 (Tnfrsf18)	糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子	1.9269
4	NM_011408	schlafen 2 (Slfn2)	增殖负调控,周期抑制	1.9083
5	NM_028228	liver- related putative tumor suppressor (LPTS1)	端粒酶抑制剂,潜在的抑癌基因	1.8344
6	NM_008321	inhibitor of DNA binding 3 (Id3)	抑制增殖、诱导凋亡,对肿瘤形成过程中血管生成起重要作用	1.8326
7	NM_020259	hedgehog-interacting protein (Hhip)	抑制乳腺癌转移,与许多肿瘤血管生成、转移等相关	1.7432
8	NM_007836	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha (Gadd45a)	抑制细胞 G2/M 的转换,促进细胞凋亡	1.6694
9	NM_011192	proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, 3 (Psme3)	抑制肿瘤生长	1.6468
上调基因(对肿瘤发生有促进作用的基因)				
1	NM_175012	gastrin releasing peptide (Grp)	肿瘤成型素,调控维持肿瘤分化	3.3695
2	NM_010233	fibronectin 1 (Fn1)	拮抗凋亡,促进肿瘤细胞转移	2.1630
3	NM_008491	lipocalin 2 (Lcn2/24P3)	与肿瘤细胞的生长、凋亡、血管生成相关	1.8403
4	NM_007695	chitinase 3-like 1 (Chi3l1)	促进细胞体外侵袭,在许多肿瘤中高表达	1.7866
5	NM_011198	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2)	促进肿瘤生长和血管生成	1.6811
6	NM_007633	cyclin E1 (Ccne1)	促进细胞 G1/S 的转换,肿瘤生长	1.6700
下调基因(对肿瘤发生有促进作用的基因)				
1	NM_008484	laminin, beta 3 (Lamb3)	促进肿瘤迁移,抑制乳腺癌细胞中雌激素的活性	0.4233
2	NM_011333	chemokine (C-C motif) ligand 2 (Ccl2)	通过诱导单核细胞到达肿瘤位置而促进乳腺癌细胞的转移	0.5142
3	NM_009627	adrenomedullin (Adm)	促进肿瘤血管生成	0.5411
4	NM_008827	placental growth factor (Pgf)	促进血管生成	0.5520
5	NM_008873	plasminogen activator, urokinase (Plau)	促进血管生成、肿瘤侵袭和生存	0.5597
6	NM_007553	bone morphogenetic protein 2 (Bmp2)	参与 EMT 过程,促进细胞迁移	0.5790
7	NM_023580	Eph receptor A1 (Epha1)	促进原位瘤的生长和转移	0.5938
8	NM_019471	matrix metalloproteinase 10 (Mmp10)	抑制凋亡,降解细胞外基质,与肿瘤的侵袭、增殖、凋亡有关	0.6087

续表 1

编号	基因库序号	基因名称	基因功能	Cy5/Cy3
下调基因(对肿瘤发生有抑制作用的基因)				
1	NM_018750	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 5 (Rassf5)	介导 Ras 依赖性的凋亡,抑癌基因	0.3142
2	NM_010884	N-myc downstream regulated gene 1 (Ndrgr1)	在肿瘤细胞中下调,肿瘤生长受抑制时上调	0.4991
3	NM_009760	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3 (Bnip3)	促进凋亡	0.5789

为了验证芯片结果的可信度,我们采用实时定量 PCR 技术对从芯片结果中选取的 5 个基因进行了验证,其中一个基因为 Twist 本身(芯片结果 Cy5/Cy3 =

0.1705,定量 PCR 结果同图 1 所示)。5 个基因的定量 PCR 结果与芯片结果基本一致,表明芯片结果可信(图 3)。

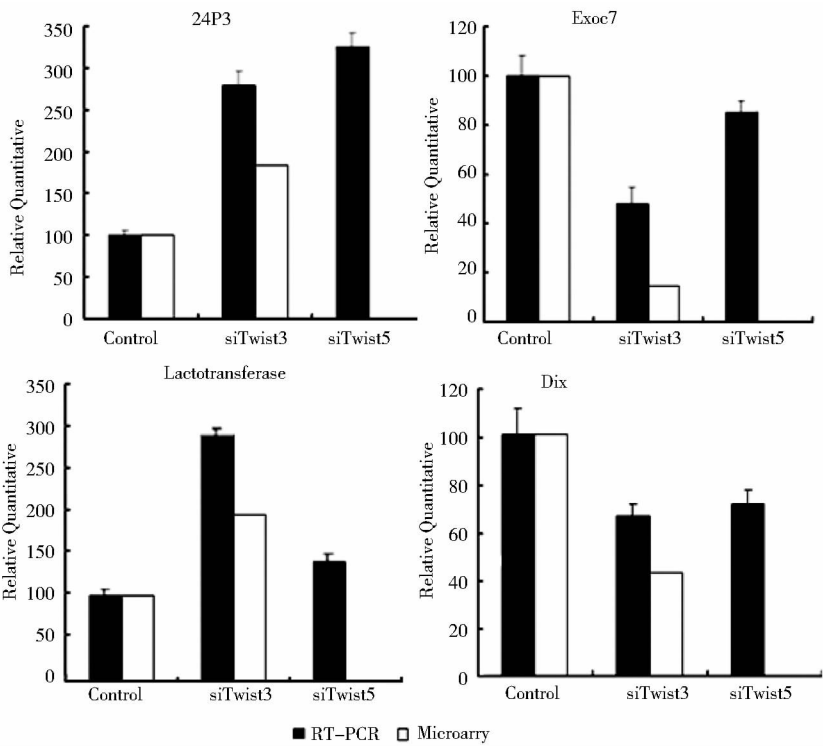


图 3 定量 PCR 检测 4T1 和 Twist 沉默的 4T1 细胞中 24p3,Exoc7,Lactotransferase 和 Dix 的 mRNA 表达量
Fig.3 Quantitative PCR analysis of 24p3, Exoc7, Lactotransferase and Dix mRNA expression in 4T1-Control and Twist – silencing 4T1 cells

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,并且造成乳腺癌患病女性死亡的根本原因不是原位瘤的生长而是由于肿瘤的转移,因而研究乳腺癌转移的分子机制具有非常重要的意义^[13]。在本研究中我们采用 RNA 干扰技术和寡核苷酸基因芯片技术对小鼠乳腺癌细胞中 Twist 调控的下游基因进行了系统的分析,结果共发现了 26 条与肿瘤发生发展相关的候选基因。如表 1 所

示,这些基因参与许多与肿瘤相关的生物学功能的调节,例如细胞周期、凋亡、血管生成等。

在乳腺癌的发生发展中, Twist 可能是通过调节一些肿瘤相关基因来促进肿瘤转移,即下调一些肿瘤抑制因子或上调一些癌基因。例如在 Twist 沉默后被上调的基因中 Gadd45a 与 p53 通路诱导的凋亡以及 NF-κB 信号通路有关^[14,15],并且另有研究发现 Twist 可以作用于 p53 依赖性和非依赖性通路以及 NF-κB 通路来调控凋亡^[16,17],因此推测 Twist 有可能会通过调节

Gadd45a 的表达来抑制凋亡促进肿瘤恶化。又如芯片结果显示 Timp2(基质金属蛋白酶 MMP2 的抑制剂)被上调,基质金属蛋白酶 MMP10 被下调,这说明在乳腺癌发展中, Twist 很可能通过调节 MMP2 及 MMP10 来降解在侵袭和转移中遇到的一系列组织屏障从而促进肿瘤转移。恶性肿瘤细胞的持续生长必须依赖于新生血管的生成,组织内血管新生的程度与肿瘤的生长、侵袭和转移密切相关,上述 26 条候选基因中大部分基因都参与影响肿瘤的血管生成,如 Ifng2 能通过抑制 VEGF 表达来抑制肿瘤血管生成。因此 Twist 可能通过调控这些基因的表达来促进血管生成和肿瘤转移。另外目前对 Twist 研究比较多的是它可以通过促进 EMT 来促进肿瘤转移,而上调基因 Hhip 可以通过抑制 Hedgehog 途径介导的 EMT 来抑制乳腺癌转移;下调的 BMP2 能够促进 EMT 过程,所以 Twist 有可能通过影响这两个基因的表达来促进 EMT 过程和肿瘤转移。

总之,肿瘤转移的影响机制是多方面、多层次的,细胞周期调控异常、过度增殖、凋亡抑制等都会促使肿瘤的恶性转化,绝大部分肿瘤转移过程中至少涉及到两个或两个以上基因的参与。Twist 可能通过直接或者间接调控以上肿瘤转移相关基因,通过影响肿瘤细胞的增殖、凋亡、血管生成等多方面功能,共同作用下促进肿瘤恶性转移。

参考文献

- [1] Howe L R, Watanabe O, Leonard J, et al. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res*, 2003, 63:1906 ~ 1913
- [2] Oshima A, Tanabe H, Yan T, et al. A novel mechanism for the regulation of osteoblast differentiation; transcription of periostin, a member of the fasciclin I family, is regulated by the bHLH transcription factor, twist. *J Cell Biochem*, 2002, 86: 792 ~ 804
- [3] Sokol N S, Ambros V. Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev*, 2005, 19:2343 ~ 2354
- [4] Yang J, Mani S A, Donaher J L, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 2004, 117:927 ~ 939
- [5] Castanon I, Baylies M K. A Twist in fate; evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene*, 2002, 287: 11 ~ 22
- [6] Thisse B, el Messal M, Perrin-Schmitt F. The twist gene; isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15:3439 ~ 3453
- [7] Kwok W K, Ling M T, Lee T W, et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res*, 2005, 65:5153 ~ 5162
- [8] Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression. *Br J Cancer*, 2006, 94:13 ~ 17
- [9] Yang J, Mani S A, Weinberg R A. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res*, 2006, 66:4549 ~ 4552
- [10] Zhang Z, Xie D, Li X, et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum Pathol*, 2007, 38:598 ~ 606
- [11] Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions; twist in development and metastasis. *Cell*, 2004, 118:277 ~ 279
- [12] Thiery J P, Morgan M. Breast cancer progression with a Twist. *Nat Med*, 2004, 10:777 ~ 778
- [13] Weigelt B, Peterse J L, van 't Veer L J. Breast cancer metastasis; markers and models. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 591 ~ 602
- [14] Bulavin D V, Kovalsky O, Hollander M C, et al. Loss of oncogenic H-ras-induced cell cycle arrest and p38 mitogen-activated protein kinase activation by disruption of Gadd45a. *Mol Cell Biol*, 2003, 23:3859 ~ 3871
- [15] Levkovitch-Verbin H, Dardik R, Vander S, et al. Experimental glaucoma and optic nerve transection induce simultaneous upregulation of proapoptotic and prosurvival genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47:2491 ~ 2497
- [16] Stasinopoulos I A, Mironchik Y, Raman A, et al. HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2005, 280:2294 ~ 2299
- [17] 罗庚求. Twist 的研究进展. *国际病理科学与临床杂志*, 2006,26(5):395 ~ 397
- Luo G Q. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2006,26(5):395 ~ 397

Regulation of Gene Expression Profile by Twist in Murine Breast Cancer Cell

YANG Jing GU Yu-chao YU Wen-gong

(College of Medicine and Pharmaceutics Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract Previous studies have revealed Twist, a basic helix-loop-helix transcription factor, plays an important role in breast cancer metastasis. To clarify the molecular mechanism of its involvement in cancer metastasis, Twist was silenced by RNAi in highly metastatic 4T1 cells. Then microarray chips were used to investigate the gene-expression pattern of the Twist-knockdown 4T1 cells and the normal 4T1 cells. The results indicated that silencing of Twist significantly suppressed lung metastasis of 4T1 cells *in vivo*. Direct comparison of gene-expression profiles showed that 167 genes in Twist-knockdown cells differed dramatically in expression levels from those in control cells. Among the 167 genes, 26 well-known tumor-associated genes, including 15 up-regulated and 11 down-regulated genes were found. These genes appear to be regulated by Twist during breast tumorigenesis. The findings provide new insights into the mechanism by which Twist is involved in tumorigenesis.

Key words Twist breast cancer Tumor metastasis Gene expression profile

广 告 索 引

AmProtein(封面), 纽英伦生物技术(北京)有限公司(封二), 爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司(彩1), 上海日泰医药设备工程有限公司(彩2), 宝生物工程(大连)有限公司(彩3), 镇江东方生物工程设备公司(彩4), 长沙开发区湘仪离心机仪器公司(彩5), 东胜创新生物技术有限公司(彩6-7), 宁波新芝生物科技股份有限公司(彩8), 上海生物芯片有限公司(彩9), 通用电气(中国)医疗集团(彩10), 第八届世界制药原料中国展(彩11), 第58届中国实验室技术及装备交易会(彩12), 赛默飞世尔科技生命科学部(彩13), 赛默飞世尔科技有限公司(彩14), 金普诺安蛋白质工程技术(北京)有限公司(31), 杭州迅数科技有限公司(中彩1), 上海国强生化装备工程有限公司(中彩2-3), 约翰克兰(天津)有限公司(中彩4), 扬中威柯特生物工程设备有限公司(后1), 杭州安普生物工程有限公司(后彩2), 通用电气(中国)医疗集团(封三), 中关村生物医药园(封底)。