

TWIST 基因及其在骨肉瘤中的研究进展

周勇 石坚 张朝跃

【摘要】 TWIST 是近年来新发现的一种癌基因蛋白,其被认为在包括骨肉瘤等在内的多种恶性肿瘤的发生、发展中起着重要的作用。骨肉瘤是骨恶性肿瘤中最常见的一种,由间质细胞系发展而来,其生长迅速,恶性程度高,预后较差。本文主要综述 TWIST 基因在临床方面的意义以及其在骨肉瘤发生发展过程中的作用,将为今后骨肉瘤的诊断、治疗与科学研究提供新的方向与指导。

【关键词】 骨肉瘤; TWIST 基因; 研究进展

Research process for TWIST gene in osteosarcoma Zhou Yong, Shi Jian, Zhang Chaoyue. Department of Orthopedics, The Third Xiangya Hospital of the Central South University, Changsha 410013, China
Corresponding author: Zhang Chaoyue, Email: zcy1958@medmail.com.cn

【Abstract】 TWIST is the new-found oncogene protein which was believed to play a prominent part in oncogenesis and tumor progression. Osteosarcoma is the most common tumor in the skeletal system which grows promptly with high degree of malignancy and poor prognosis. This paper mainly summarized TWIST gene in terms of clinical significance as well as the role it plays in the process of the occurrence and development of osteosarcoma, and will give a new direction for diagnosis and treatment of osteosarcoma and scientific research in the future.

【Key words】 Osteosarcoma; TWIST gene; Research process

一、TWIST 的发现、结构与功能

TWIST 基因在 Thisse 等^[1]研究果蝇胚胎发育时首先被发现,其属于 bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 类型的转录因子,它在人类及小鼠中的氨基酸序列具有 96% 的同源性,并且在不同的种属中其 DNA 结合区域具有 100% 的保守序列,即它们都能结合一种 E-box 的 DNA 序列^[2]。人类的 Twist 基因定位于 7p21.2 处,其包含 1 个内含子以及 2 个外显子,其中内含子长 538 bp, mRNA 全长 1 669 bp,第 1 个外显子长 772 bp,包含整个编码区域。人 Twist 蛋白分子共包含 202 个氨基酸,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^[3]。Twist 起初被认为是在胚胎发育中起到关键调控作用的转录因子,能够广泛参与调控肿瘤发生、细胞增殖、分化以及器官生长发育等过程,同时给予细胞以迁移能力。而在胚胎发育过程中, TWIST 对于中胚层及分化的中胚层衍生组织也是必不可少的^[4-5]。

二、TWIST 与细胞信号转导

人类 GLI1 基因的表达可被 TWIST 激活,而多功能的转录因子 Gli 蛋白家族的另外一个同源基因 GLI3 也能够与 TWIST 相互作用^[6]。TWIST 使波形蛋白 (vimentin) 基因表达上调,继而激活包括细胞外因子 (Wnt)、胞质蛋白 (β -catenin)、跨膜受体 (frizzled) 以及核内转录因子 (TCF-4) 等一系列蛋白的 Wnt 信号通路^[7]。O'Rourke 等^[8]也证实了 TWIST 对于 FGF 和 Shh 信号转导的重要作用。此外,磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 通路和 TGF β -SMAD 通路被认为可能会激活 TWIST 的表达^[9]。

三、TWIST 在肿瘤中的作用

许多研究已经证实, TWIST 与肿瘤的发生和发展有着紧密的联系。TWIST 在多种肿瘤中表达上调,通过影响肿瘤细胞的凋亡,抑制分化,诱导表皮-间叶细胞转换,参与肿瘤血管生成等从而在肿瘤的发生和发展中起重要作用。

1. TWIST 与细胞凋亡: 细胞凋亡是一个十分重要的生理过程,而凋亡被过度抑制是导致肿瘤发生的原因之一。作为一种凋亡抑制蛋白, TWIST 的过量表达可能促进细胞表型恶性转化^[10]。20 世纪 90 年代就有学者提出 TWIST 可能是通过阻碍癌基因 myc 的促凋亡作用从而抑制肿瘤细胞的凋亡^[11]。也

有研究者认为 TWIST 可以激活或者抑制包括凋亡基因在内的各种不同靶基因, 继而将抗凋亡程序激活, 使上皮细胞发生表皮-间叶细胞转换, 从而增强细胞的抗凋亡能力^[12]。TWIST 亦能抑制抗癌基因 p53, 从而促进肿瘤形成; p53 基因的上游调控子 ARF 受到 TWIST 调控而减少了表达, 继而导致 p53 基因的不稳定; 也可通过阻断 p53 基因翻译后修饰, 使 P53 基因介导的细胞凋亡途径失活; TWIST 还能够通过抑制转录共激活子 P300 介导的乙酰化作用从而抑制 p53 基因介导的基因转录; 也能够作用于对核转录因子 NF- κ B 所控制的抗凋亡因子^[13-14]。

2. TWIST 与肿瘤血管的形成: 肿瘤血管的生成是一个包含多个步骤的复杂过程, 并受到多种因子的调节作用。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是其中最为重要的调节因子之一。它能够增加肿瘤血管的通透性, 促进血管内皮细胞的生长、增殖以及转移。VEGF 在许多恶性肿瘤中都出现了表达增加的现象。在肿瘤血管发生方面, 高表达 TWIST 的 MCF7 乳腺癌细胞鼠种植实验动物模型中, 发现肿瘤血管流量和血管渗透性有着显著升高^[15]; Hu 等^[16]研究人员也发现了凝血酶可以上调 TWIST, 而 TWIST 的上调又可诱导许多血管生长因子和受体 (如 VEGF、KDR、ANG-2、Tie 2、MMP-1 和 CD31 等) 的上调; 若下调 TWIST 的表达, 可使小鼠黑色素瘤细胞系中血管的生成显著降低。Niu 等^[17]研究显示, 肝癌组织中微血管密度在 TWIST 表达阳性的肿瘤细胞的表达要高于 TWIST 表达阴性的肿瘤细胞, TWIST 蛋白的过度表达与 VEGF 的表达呈正相关。

3. TWIST 与肿瘤转移: 肿瘤的转移需要通过多种基因及信号通路调控, 是一个十分复杂的过程。而肿瘤细胞的分离与适应都需要通过表皮-间叶细胞转换 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 从而获得相应能力。研究表明, TWIST 是 EMT 过程中的关键调控因子, 对肿瘤的侵袭和转移有重要影响, 其异常高表达可能引起肿瘤^[18]。

E-钙粘蛋白 (E-cadherin) 是一类依赖 Ca^{2+} 介导相邻细胞间黏附的 I 型跨膜糖蛋白。它可以与 β -连环蛋白 (β -catenin) 相互结合而形成一种复合体, 用以维持细胞间黏附的稳定性以及细胞的极性。上皮细胞间连接需要通过 E-钙粘蛋白来完成。而 EMT 的最核心便是 E-钙粘蛋白的缺失。EMT 继而会使得肿瘤细胞从原发灶中分离。通过对 EMT 基因标

记的检测, Kang 等^[19]发现在 EMT 参与肿瘤细胞的迁移、侵袭和转移过程中, TWIST 基因起着重要的作用。近年来的多种研究更是显示, TWIST 的高表达伴随有 E-cadherin 的表达抑制。TWIST 在 E-钙粘蛋白的调节过程中扮演着非常重要的角色。Yang 等^[20]也认为, 作为一种 bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 类型的转录因子, TWIST 能够以二聚体形式和其他的螺旋-环-螺旋蛋白相结合, 继而抑制或者活化不同下游区目标, 从而实现对 E-钙粘蛋白的调节。因而, TWIST 的表达上调, 通过抑制了 E-钙粘蛋白的表达引发上皮-间质转变, 使肿瘤细胞迁移、侵袭能力提高。

要指出的是, TWIST 并不是唯一的 EMT 调节因子, 大量的研究表明许多生长因子及受体, 转录因子以及转化生长因子 β (TGF β) 等均能够在不同细胞中诱导 EMT^[21]。这些因子或单独或协同^[22], 构成了 EMT 信号调节网络, 通过对 TWIST 表达的调控, 作用于肿瘤细胞的迁移、侵袭、转移和增殖。

四、TWIST 与骨肉瘤

骨肉瘤是一种起源于间叶组织的恶性肿瘤, 青少年较为多见。骨肉瘤好发于干骺端, 此处血运丰富因而血行转移早且发生率较高, 进展也十分迅速。既往骨肉瘤多采取手术治疗, 术后 5 年生存率较低。近年来, 新辅助化疗 (neoadjuvant chemotherapy, NC) 的出现让骨肉瘤患者的 5 年生存率大为提高, 以往的截肢手术也逐渐被保肢手术所取代, 基因治疗、免疫治疗等新疗法也为骨肉瘤的治疗开辟了崭新的道路。

1. TWIST 与骨肉瘤的发生发展: TWIST 单倍剂量不足已被证明会对小鼠和人类的骨骼发育产生损害。近年来的研究显示, TWIST 的异常高表达可能引起肿瘤。在高表达的 TWIST 中已检测到几种类型的肿瘤并且已至肿瘤转移进展的初始阶段^[23-24]。相比之下, 在均匀的 OS 患者序列中, TWIST 基因却在肿瘤诊断中经常被删除^[25]。其单倍剂量不足与患者的预后较差显著相关^[26]。

国内外对于 TWIST 在骨肉瘤中的研究还处于初始阶段, Entz-Werlé 等^[27]曾报道, 小儿骨肉瘤的发生与 TWIST 相关染色体组的变异有着重要关系, 而 Entz-Werlé 等^[28]及其科研团队又发现了 MET、Twist 在小儿骨肉瘤的形成中的作用。Kronenberg 等^[29]证实了成骨细胞特异性转录因子 2 (Osf2) 能够被 TWIST 调节从而影响骨的生长; 与此相反的

是, TWIST 的高表达有可能导致特异性转录因子 2 的异常增高。它将致使骨细胞的分化加速, 继而有可能导致骨肿瘤的发生发展。此外, 何昀等^[30]筛选特异性沉默人的 TWIST 基因的 siRNA 序列, 构建 siTWIST 腺病毒并在 MG63 及 143B 骨肉瘤细胞中进行功能鉴定。结果发现在 HEK293 细胞中, 四组 siTWIST 中有两组 GFP 表达明显降低, 且 siTWIST 腺病毒能抑制 143B 骨肉瘤细胞中内源性的 TWIST 表达, TWIST 腺病毒能促进 MG63 骨肉瘤细胞的增殖和转移, 而 siTWIST 与 TWIST 共感染组 MG63 细胞的增殖及迁徙率均明显低于 TWIST 组。将成功构建的腺病毒转染细胞后, 能够有效地抑制 TWIST 的表达, 它为我们进一步研究 TWIST 在骨肉瘤中的作用提供了有效的分子工具。

2. TWIST 与骨肉瘤耐药: Nakase 等^[31]用 wtp53 基因转染骨肉瘤细胞, 在体外及动物模型中均有显示肿瘤增长受抑制。Ganjavi 等^[32]则用分别携带野生型、突变型 p53 基因的腺病毒载体, 转染骨肉瘤细胞, 发现转染野生型 p53 基因的肿瘤细胞均不同程度地出现增殖能力降低, 同时转染野生型 p53 基因的肿瘤细胞对化疗药物的敏感性增加。而 Zhou 等^[23]的研究也显示, TWIST 通过抑制多种信号通路来增强顺铂诱导的 OS 细胞凋亡, 而 miR-33a 通过下调 TWIST 也能够提高骨肉瘤细胞对顺铂的耐药性。

TWIST 在 Saos-2 和 MG-63 在骨肉瘤细胞中过度表达, 同时也被反义抑制。而与之区别的是, 在 Saos-2 细胞中被过度表达的 TWIST 却显著降低了 ET-1 mRNA 和蛋白表达水平。在顺铂和 Akt 磷酸化丝氨酸 473 (Ser473) 作用下的细胞生存率, 被选择性磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K) 抑制剂所影响而降低, 例如选择性 ETAR 抑制剂、BQ123 等。而在 MG-63 细胞中, 反义抑制的 TWIST 显著增加了 ET-1 的表达以及在顺铂 Akt 磷酸化 Ser473 作用下的细胞生存率。然而, 外源性 ET-1 只减少了部分顺铂诱导下, 在 LY294002 中反义抑制的 TWIST 的细胞凋亡。TWIST 却显著地通过抑制 PI3K/Akt 通路来下调 ET-1/ETAR 信号, 以降低 OS 细胞对顺铂的生存率。

五、展望

现代医学的不断发展, 基因治疗与分子靶向治疗的不断进步, 都为骨肉瘤研究治疗的突破带来了新的曙光。多学科的交叉整合以及分子遗传学的不断发展也会为骨肉瘤研究取得更大的突破而助一臂之力。TWIST 的研究发现也增添了关于骨肉瘤发

生发展分子机制的新思路, 为细胞存活及耐药性带来了全新的见解, 同时也提供了潜在的治疗靶点。相信通过对 TWIST 功能的精细研究, 以其为靶点的分子治疗将在骨肉瘤的研究中写下崭新的篇章。

参 考 文 献

- [1] Thisse B, Stoetzel C, Gorostiza-Thisse C, et al. Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early Drosophila embryos[J]. The EMBO Journal, 1988, 7(7): 2175.
- [2] 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.
- [3] Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, et al. Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein[J]. Science, 1995, 268(5212): 836-844.
- [4] Entz-Werlé N, Lavaux T, Metzger N, et al. Involvement of MET/TWIST/APC combination or the potential role of ossification factors in pediatric high-grade osteosarcoma oncogenesis. Neoplasia, 2007;9: 678-688.
- [5] Van Dusen NJ, Firulli AB. Twist factor regulation of non-cardiomyocyte cell lineages in the developing heart[J]. Differentiation, 2012, 84(1): 79-88.
- [6] Villavicencio EH, Yoon JW, Frank DJ, et al. Cooperative E-box regulation of human GLI1 by TWIST and USF[J]. Genesis, 2002, 32(4): 247-258.
- [7] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. Cell, 2004, 117(7): 927-939.
- [8] O'Rourke MP, Soo K, Behringer RR, et al. Twist Plays an Essential Role in FGF and SHH Signal Transduction during Mouse Limb Development[J]. Developmental Biology, 2002, 248(1): 143-156.
- [9] Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction[J]. Journal of Clinical Investigation, 1997, 100(9): 2153.
- [10] Puisieux A, Valsesia-Wittmann S. Cancer cells escape from failsafe programs in a simple Twist[J]. Bull Cancer, 2006, 93(3): 251-256.
- [11] Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, et al. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis[J]. Genes Dev, 1999, 13(17): 2207-2217.
- [12] Yang J, Mani SA, Weinberg RA. Exploring anew twist on tumor metastasis[J]. Cancer Res, 2006, 66(9): 4549-4552.
- [13] Hamamori Y, Sartorelli V, Ogrzyzko V, et al. Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A[J]. Cell, 1999, 96(3): 405-413.
- [14] Kwok WK, Ling MT, Lee TW, et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target[J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5153-5162.
- [15] Mironchik Y, Winnard PT, Jr. Vesuna F, et al. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 10801-10809.
- [16] Hu L, Roth JM, Brooks P, et al. Twist is required for thrombin-induced tumor angiogenesis and growth[J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4296-4302.
- [17] 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.
- [18] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119(6): 1420.
- [19] Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis[J]. *Cell*, 2004, 118(3): 277-279.
- [20] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939.
- [21] Willis BC, Borok Z. TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease[J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2007, 293(3): L525-L534.
- [22] Ganjavi H, Gee M, Narendran A, et al. Adenovirus-mediated p53 gene therapy in osteosarcoma cell lines: sensitization to cisplatin and doxorubicin[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2005, 13(4): 415-419.
- [23] Zhou Y, Zang X, Huang Z, et al. TWIST interacts with endothelin-1/endothelin A receptor signaling in osteosarcoma cell survival against cisplatin[J]. *Oncology Letters*, 2013, 5(3): 857-861.
- [24] Entz-Werlé N, Choquet P, Neuville A, et al. Targeted apc; twist double-mutant mice: a new model of spontaneous osteosarcoma that mimics the human disease. *Transl Oncol*, 2010, 3(6): 344-353.
- [25] Le Deley MC, Guinebretière J, Gentet JC, et al. SFOP OS94: a randomised trial comparing preoperative high-dose methotrexate plus doxorubicin to high-dose methotrexate plus etoposide and ifosfamide in osteosarcoma patients. *Eur J Cancer*, 2007, 43 (4): 752-761.
- [26] Entz-Werlé N, Lavaux T, Metzger N, et al. Involvement of MET/TWIST/APC combination or the potential role of ossification factors in pediatric high-grade osteosarcoma oncogenesis. *Neoplasia*, 2007, 9 (8): 678-688.
- [27] Entz-Werlé N, Stoetzel C, Berard-Marec P, et al. Frequent genomic abnormalities at Twist in human pediatric osteosarcomas[J]. *Cancer*, 2005, 17(3): 349-355.
- [28] Entz-Werlé N, Choquet P, Neuville A, et al. Targeted apc; twist double-mutant mice: a new model of spontaneous osteosarcoma that mimics the human disease[J]. *Transl Oncol*, 2010, 3(6): 344-353.
- [29] Kronenberg HM. Twist Genes Regulate Runx2 and Bone Formation[J]. *Dev Cell*, 2004, 6(3): 423-435.
- [30] 何昀, 毕杨, 刘星, 等. 转录因子 Twist 的 SiRNA 筛选、腺病毒构建及功能检测[J]. *医学分子生物学杂志*, 2010, 7(3): 236-241.
- [31] Takahashi A, Ohnishi K, Kondo N, et al. Effective new cancer therapies which are independent of P53 gene status[J]. 2010.
- [32] Ganjavi H, Gee M, Narendran A, et al. Adenovirus-mediated p53 gene therapy in osteosarcoma cell lines: sensitization to cisplatin and doxorubicin[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2005, 13(4): 415-419.

(收稿日期: 2014-02-18)

(本文编辑: 张岚)

周勇, 石坚, 张朝跃. TWIST 基因及其在骨肉瘤中的研究进展 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8 (6): 1168-1171.

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION
1915
中 华 医 学 会