

治疗的一个关键靶点。

参考文献:

- [1] Favoriti P, Carbone G, Greco M, et al. Worldwide burden of colorectal cancer: a review[J]. *Updates Surg*, 2016,68(1):7
- [2] Costi R, Leonardi F, Zanoni D, et al. Palliative care and end-stage colorectal cancer management: the surgeon meets the oncologist[J]. *World J Gastroenterol*, 2014,20(24):7602
- [3] Son H, Moon A. Epithelial-mesenchymal transition and cell invasion[J]. *Toxicol Res*, 2010,26(4):245
- [4] Creighton C J, Gibbons D L, Kurie J M. The role of epithelial-mesenchymal transition programming in invasion and metastasis: a clinical perspective[J]. *Cancer Manag Res*, 2013,5:187
- [5] Lee K W, Yeo S Y, Sung C O, et al. Twist1 is a key regulator of cancer-associated fibroblasts[J]. *Cancer Res*, 2015,75(1):73
- [6] Zou H, Feng X, Cao J G. Twist in hepatocellular carcinoma: pathophysiology and therapeutics[J]. *Hepatol Int*, 2015,9(3):399
- [7] Vesuna F, Bergman Y, Raman V. Genomic pathways modulated by Twist in breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2017,17(1):52.
- [8] Zhuo X, Chang A, Huang C, et al. Expression of TWIST, an inducer of epithelial-mesenchymal transition, in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014,7(12):8862
- [9] Sun H X, Feng H, Song Y. Expression of Twist and relation with epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma[J]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2015,33(5):534
- [10] Chen T, You Y, Jiang H, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation and tumorigenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2017. [Epub ahead of print]
- [11] Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2001,77(3):201
- [12] Liu C Y, Lin H H, Tang M J, et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation[J]. *Oncotarget*, 2015,6(18):15966
- [13] 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):79
- [14] Gao Y, Xuan X Y, Zhang H Y, et al. Relationship between Twist expression and epithelial-mesenchymal transition of oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cell Biol Int*, 2012,36(6):571
- [15] Ru G Q, Wang H J, Xu W J, et al. Upregulation of Twist in gastric carcinoma associated with tumor invasion and poor prognosis [J]. *Pathol Oncol Res*, 2011,17(2):341

(2017-02-21 收稿)

(上接第 509 页)

SEP,监测 MP 治疗 CCSCI 后 SEP 图形的改变,并且有病理学切片加以论证,结果可以表明哪个时间点 MP 治疗更为有效,可以为临床治疗慢性脊髓损伤的 MP 的应用提供理论支持。

参考文献:

- [1] Nieuwenhuijse M J, Van Erkel A R, Dijkstra P D. Percutaneous vertebroplasty for subacute and chronic painful osteoporotic vertebral compression fractures can safely be undertaken in the first year after the onset of symptoms[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2012, 94(6):815
- [2] Tesla R, Wolf H P, Xu P, et al. Neuroprotective efficacy of aminopropyl carbazoles in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012,109(42):17016
- [3] Hu Y, Wen C Y, Li T H, et al. Somatosensory-evoked potentials as an indicator for the extent of ultrastructural damage of the spinal cord after chronic compressive injuries in a rat model[J]. *Clin Neurophysiol*, 2011, 122(7):1440
- [4] Hua R R, Li P, Yang J, et al. Evaluation of somatosensory evoked potential and pain rating index in a patient with spinal cord injury accepted cell therapy[J]. *Pain Physician*, 2016, 19: E659
- [5] Long H Q, Li G S, Lin E J, et al. Is the speed of chronic compression an important factor for chronic spinal cord injury rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2013,545:75
- [6] Morris S H, Howard J J, El-Hawary R. Comparison of motor-evoked potentials versus somatosensory-evoked potentials as early indicators of neural compromise in rat model of pinal cord compression[J]. *Spine*, 2017, 42(6): E326
- [7] Song C, Wang K, Yu Z Q, et al. Anterior decompression and internal fixation for lower cervical spine dislocation[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2016, 9(2):4143
- [8] Wang Y, Zhang Z, Li X, et al. Usefulness of time-frequency patterns of somatosensory evoked potentials in identification of the location of spinal cord injury[J]. *Clin Neurophysiol*, 2015, 32(4): 341
- [9] Thirumala P, Zhou J, Krishnan R, et al. Diagnostic accuracy of evoked potentials for functional impairment after contusive spinal cord injury in adult rats[J]. *J Clin Neuroscience*, 2016, 25: 122
- [10] Wang Y, Li G, Luk K D K, et al. Component analysis of somatosensory evoked potentials for identifying spinal cord injury location[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 2351
- [11] 杨建东, 贾连顺. 预防使用大剂量甲基强的松龙对大鼠急性脊髓损伤神经保护作用的实验研究[M]. 第二军医大学外科学(骨科): 2004: 115-115
- [12] Thirumala P D, Huang J, Thiagarajan K, et al. Diagnostic accuracy of combined multimodality somatosensory evoked potential and transcranial motor evoked potential intraoperative monitoring in patients with idiopathic scoliosis[J]. *Spine*, 2016, 41(19): E1177
- [13] 伍亚民,王正国,朱佩芳,等.脊髓缺血损伤模型及行为学的实验研究[J].中华创伤杂志,2000,16(3):157

(2017-04-23 收稿)

文章编号 1006-8147(2017)06-0510-06

论 著

Twist 基因对结肠癌细胞系侵袭转移能力影响的体外研究

王多伟¹, Bikash Rai^{1,2}, 王金淼¹, 戚峰¹, 刘彤¹

(1.天津医科大学总医院普通外科,天津 300052;2.北京和睦家医院外科,北京 100015)

摘要 目的:探讨 Twist 基因在 SW480、HCT116 和 HT29 结肠癌细胞系上皮-间质转化(EMT)中的作用,明确其对恶性肿瘤侵袭转移能力的影响。方法:利用重组质粒 pTracer-CMV/BSD-Twist 和 pGenesil1.2-Twist-shRNA 转染 SW480、HT29 和 HCT116;流式细胞术检测转染率;Real time-PCR 和 Western blot 检测 Twist、E-cadherin 和 Vimentin 转录及蛋白表达水平;Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力。结果:转染高表达 Twist 质粒后,各结肠癌细胞系中 Twist 和 Vimentin 表达水平显著升高($P<0.05$),E-cadherin 显著降低($P<0.05$);转染低表达 Twist 质粒后,SW480 和 HT29 中各指标均无显著变化($P>0.05$),HCT116 中 Twist 和 Vimentin 表达水平显著降低($P<0.05$),E-cadherin 无显著变化($P>0.05$);Transwell 实验表明抑制 HCT116 细胞系 Twist 表达后,其侵袭和迁移能力明显减弱($P<0.01$)。结论:上调 Twist 表达可以促进 EMT;抑制 HCT116 中 Twist 表达能减弱结肠癌细胞的侵袭和转移能力。

关键词 Twist 基因;上皮间质转化;结肠癌;质粒;shRNA;侵袭和转移

中图分类号 R735.3*5

文献标志码 A

Research on the influence of Twist gene on invasion and metastasis of colon cancer cell lines *in vitro*

WANG Duo-wei¹, Bikash Rai^{1,2}, WANG Jin-miao¹, QI Feng¹, LIU Tong¹

(1. Department of General Surgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Surgery, Beijing United Family Hospital, Beijing 100015, China)

Abstract **Objective:** To explore the role of Twist gene in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in SW480, HCT116 and HT29, and then study the effect of Twist on invasion and metastasis of malignant tumors. **Methods:** Recombinant plasmids pTracer-CMV/BSD-Twist and pGenesil1.2-Twist-shRNA were used to transfect SW480, HCT116 and HT29. Transfection efficacy of the plasmid in each cell line was confirmed by flowcytometry. The mRNA transcription level and protein expression level of Twist, E-cadherin and Vimentin were detected by RT-PCR and western blot, respectively. The migration and invasive analysis was done by transwell assay. **Results:** After transfected by recombinant high-expressed twist plasmid, the mRNA and protein expression levels of Twist and Vimentin increased significantly ($P<0.05$), whereas E-cadherin was inhibited ($P<0.05$). After transfected by recombinant low-expressed twist plasmid, all the parameters in SW480 and HT29 cell lines were statistically insignificant ($P>0.05$), the mRNA and protein levels of Twist and Vimentin were prominently inhibited in HCT116 cell line ($P<0.05$) and the level of E-cadherin was not statistically significant ($P>0.05$). Significant reduction of invasion and migration was observed in transwell assay after inhibiting the Twist expression in HCT116 cell line ($P<0.01$). **Conclusion:** Up-regulation of Twist gene expression can promote the EMT and inhibiting the Twist gene expression can lessen the migration and invasion of HCT116.

Key words Twist gene; epithelial-mesenchymal transition; colon carcinoma; plasmid; shRNA; invasion and metastasis

结肠癌是世界上第三大常见恶性肿瘤,在造成人类死亡的肿瘤中高居第4位^[1]。近年来,在全球医学人员尤其肿瘤专家的共同努力下,结肠癌的早期诊断和综合治疗水平明显提高,尽管如此,临床上对于已经发生同时性和异时性转移的晚期结肠癌患者,目前根治性治疗的手段仍十分有限^[2]。越来越多的证据表明上皮-间质转变(epithelial-

mesenchymal transition, EMT)在恶性肿瘤细胞的浸润和转移中起到了根本性作用^[3-4]。近年来,研究证实 Twist 是一种致癌基因,影响肿瘤细胞的凋亡,促进肿瘤的发生和进展,在很多恶性肿瘤中均有异常表达^[5-7]。另外, Twist 基因介导的 EMT 在肿瘤细胞侵袭转移过程中发挥重要作用^[8-9],然而其具体机制尚不清楚,因此本研究旨在调控结肠癌细胞中 Twist 表达水平后,探讨结肠癌细胞发生 EMT 的分子机制,并进一步明确其对恶性肿瘤侵袭和转移能力的影响。

基金项目 天津医科大学总医院科研基金项目(2YYFY2016021)

作者简介 王多伟(1990-),男,硕士在读,研究方向:普通外科;

通信作者:戚峰, E-mail: qf@medmail.com.cn。

1 材料与方法

1.1 实验对象和主要试剂

1.1.1 实验材料 质粒 pTracer-CMV/BSD-Twist、pTracer-CMV/BSD (本实验室保存), 质粒 pGenesil1.2-Twist-shRNA、pGenesil1.2-shRNA (武汉晶赛生物工程技术有限公司设计构建); 大肠杆菌感受态细胞 DH α (天根生物科技(北京)有限公司); 人结肠癌细胞系 SW480 和 HT26 (天津南开大学生命科学学院)、HCT116 细胞系 (中国医学科学院肿瘤细胞库)。

1.1.2 主要试剂 高纯度质粒小量快速提取试剂盒 (天津沙船生物科技有限公司); 限制性内切酶: *EcoR* I、*Nhe* I、*Bsa* I、*Sac* I (NEB, 美国); 无内毒素质粒大提试剂盒、2 \times RT MasterMix 和总 RNA 提取试剂盒 (天根生物科技(北京)有限公司); Lipofectamine 2000 基因转染试剂盒、高容量 cDNA 反转录试剂盒和 SYBR Select Master Mix (Invitrogen 公司, 美国); Twist 多克隆抗体 (SantaCurz, 美国); E-cadherin、Vimentin、GAPDH 单克隆抗体和辣根酶标记山羊抗兔抗体 (Cell Signaling Technology, 美国); Western blot 发光液 (Millipore 公司, 美国)。

1.2 研究方法

1.2.1 质粒提取及转染 将 2 μ L 质粒 DNA 加入到装有 DH α 感受态细胞的 EP 管混匀, 冰浴 30 min, 预加热至 42 $^{\circ}$ C, 90 s, 冰浴 2 min, 加入 500 μ L LB 培养液, 37 $^{\circ}$ C, 150 r/min 温育 45 min, 转移至含抗生素 LB 板培养, 取质粒菌落接种于 LB AMP+液体培养基 3 mL, 37 $^{\circ}$ C 培养 14 h 后, 提取目的质粒置于 -20 $^{\circ}$ C 冻存。使用 Lipofectamin 2000 转染试剂盒转染 SW480、HCT116 和 HT29 细胞系, 各细胞系分为 5 组: 上调实验组 (转染高表达 Twist 基因质粒 pTracer-CMV/BSD-Twist 组, 1 组)、上调阴性对照组 (转染空质粒 pTracer-CMV/BSD 组, 2 组)、下调实验组 (转染 Twist 基因干扰质粒 pGenesil1.2-Twist-shRNA, 3 组)、下调阴性对照组 (空质粒 pGenesil1.2-shRNA, 4 组) 和空白对照组 (Non transfected 组, 5 组), 细胞培养 48 h 后, 于倒置荧光显微镜下观察细胞转染情况 (GFP) 的表达, 用流式细胞仪检测细胞转染效率。

1.2.2 RT-PCR 及 Western blot 检测转染前后 Twist、Vimentin、E-cadherin 表达水平 Trizol 法分别提取结肠癌细胞转染后各组中总 RNA, 需测定基因引物序列, Twist, 上游: 5'-GGAGTCCGCAGTCT-TACGAG-3', 下游: 5'-TCTGGAGGACCTGGTA-

GAGG-3' (扩增片段长度 200 bp); E-cadherin, 上游: 5'-GTGTCATCCAACGGGAATGC-3', 下游: 5'-TGGCGGCATTGTAGGTGTTTC-3' (扩增片段长度 196 bp); Vimentin: 上游: 5'-ATGACCGCTTCGC-CAACTAC-3', 下游: 5'-CGGGCTTTGTCGTTGGT-TAG-3' (扩增片段长度 178 bp); GAPDH (内参基因), 上游: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 下游: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3', 2- $\Delta\Delta C_t$ 法计算 mRNA 的相对表达量, 采用蛋白印迹法 (Western blot) 检测 Twist、Vimentin 和 E-cadherin 基因蛋白表达水平。

1.2.3 Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移能力

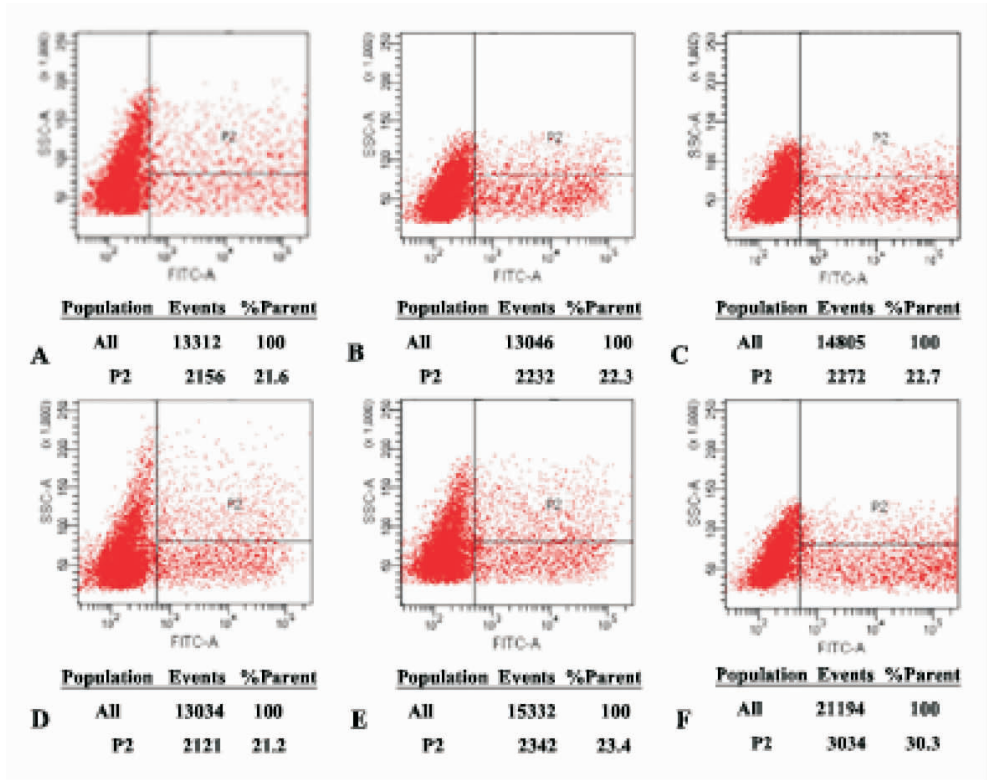
1.2.3.1 Transwell 侵袭实验: 用 50 mg/L Matrigel 1:8 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面, 于每 Transwell 小室中加入 50 μ L 含 10 g/L 的 BSA 无血清培养液, 30 min 后用胰酶消化收集细胞, PBS 缓冲液洗涤 2 遍, 加入不含血清的细胞培养基重悬细胞至 5 $\times 10^5$ /mL, 在 Transwell 下室内加入含 10% 胎牛血清细胞培养基 600 μ L, 上室内加入各组细胞的无胎牛血清培养基悬浮液 200 μ L, 上室内细胞数为 1 $\times 10^5$, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 将 Transwell 小室置于苏木素染色液中 3 min, 倒置显微镜下计数移至微孔膜下层每视野的细胞数, 随机计数 5 个高倍视野, 求平均值。

1.2.3.2 Transwell 迁移实验: 在 Transwell 下室中加入含 10% FBS 的培养基 600 μ L, 在上室孔中加入细胞 1 $\times 10^5$ 个/孔, 细胞悬液体积 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 培养 2.5 h, 5% 戊二醛固定 10 min, 用棉签拭去小室上面细胞。将 Transwell 小室置于苏木素染色液中 3 min, 倒置显微镜下计算进入下室的细胞数。

1.3 统计学方法 运用统计软件 SPSS17.0 进行数据处理, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD 法, 所有统计结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义标准。

2 结果

2.1 质粒转染结果 质粒 pTracer-CMV/BSD-Twist, pTracer-CMV/BSD, pGenesil1.2-Twist-shRNA 和 pGenesil1.2-shRNA 转染 SW480、HCT116 和 HT29 结肠癌细胞系 48 h 后, 倒置荧光显微镜下观察 GFP 表达, 结果均发出绿色荧光, 表明转染成功。流式细胞仪检测 pTracer-CMV/BSD-Twist 质粒转染 SW480、HCT116、HT29 的效率分别为 21.6%、22.3%、22.7%, pGenesil1.2-Twist-shRNA 质粒转染 SW480、HCT116、HT29 的效率分别为 21.2%、23.4%、30.3% (图 1)。



A:SW480 中 pTracer-CMV/BSD-Twist 的转染率;B:HCT116 中 pTracer-CMV/BSD-Twist 的转染率;C:HT29 中 pTracer-CMV/BSD-Twist 的转染率;D:SW480 中 pGenesil1.2-Twist-shRNA 的转染率;E:HCT116 中 pGenesil1.2-Twist-shRNA 的转染率;F:HT29 中 pGenesil1.2-Twist-shRNA 的转染率

图 1 各细胞系中质粒的转染效率
Fig 1 Transfection efficacy of plasmids in each cell line

2.2 经不同质粒转染后各细胞系中 Twist、E-cadherin、Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平 质粒 pTracer-CMV/BSD-Twist 转染后,各细胞系中 Twist、Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$);质

粒 Genesil1.2-Twist-shRNA 转染后,SW480 和 HT29 中 Twist、E-cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平均无显著变化 ($P>0.05$),HCT116 中 Twist 和 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$),E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平差异不显著 ($P>0.05$)(表 1,表 2)。

表 1 各细胞系中 Twist、Vimentin、E-cadherin 的 mRNA 表达水平
Tab 1 Expression levels of mRNA of Twist, Vimentin and E-cadherin in each cell line

组别	各基因的 mRNA 表达水平(2 ^{-ΔΔCt})								
	Twist			Vimentin			E-cadherin		
	SW480	HCT116	HT29	SW480	HCT116	HT29	SW480	HCT116	HT29
1	45.26*	69.56*	55.72*	20.39*	43.71*	40.50*	0.05*	0.01*	0.01*
2	1.45	18.81	1.03	1.30	15.14	1.09	0.97	1.00	0.99
3	1.04	5.04*	1.06	1.21	2.35*	1.12	1.01	1.01	1.10
4	0.98	23.00	0.99	1.27	14.62	1.13	0.98	1.04	1.09
5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Twist,Vimentin:SW480 和 HT29 中,1 分别与 2、3、4、5 各组比较,* $P<0.01$;2、3、4、5 各组两两比较, $P>0.05$;HCT116 中,1 分别与 2、3、4、5 各组比较 * $P<0.01$;3 分别与 2、4、5 各组比较,* $P<0.01$;2、4、5 各组两两比较, $P>0.05$;E-cadherin:SW480,HCT116 和 HT29 中,1 分别与 2、3、4、5 各组比较,* $P<0.01$;2、3、4、5 各组两两比较, $P>0.05$

表 2 各细胞系中 Twist、Vimentin、E-cadherin 的蛋白表达水平
Tab 2 Expression levels of protein of Twist, Viemntin and E-cadherin in each cell line

组别	各基因的蛋白表达水平(灰度比值)								
	Twist			Vimentin			E-cadherin		
	SW480	HCT116	HT29	SW480	HCT116	HT29	SW480	HCT116	HT29
1	0.92±0.05*	0.95±0.06*	0.89±0.01*	0.98±0.02*	0.98±0.01*	0.95±0.05*	0.55±0.02*	0.55±0.01*	0.52±0.05*
2	0.81±0.04	0.80±0.05	0.61±0.02	0.50±0.01	0.70±0.07	0.45±0.04	0.91±0.01	0.89±0.05	0.81±0.04
3	0.80±0.02	0.55±0.04*	0.60±0.03	0.52±0.03	0.35±0.03*	0.47±0.02	0.93±0.04	0.90±0.03	0.80±0.02
4	0.80±0.04	0.81±0.02	0.62±0.08	0.50±0.04	0.71±0.02	0.46±0.04	0.92±0.02	0.88±0.02	0.84±0.04
5	0.82±0.06	0.82±0.01	0.63±0.07	0.51±0.06	0.72±0.08	0.45±0.06	0.90±0.04	0.91±0.08	0.83±0.06
F	7.58	5.38	6.48	7.35	9.23	6.23	8.38	7.88	8.23
P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Twist, Vimentin:SW480 和 HT29 中,1 与 2、3、4、5 各组比较,* $P<0.01$;2、3、4、5 各组间比较, $P>0.05$;HCT116 中,1 与 2、3、4、5 各组比较,* $P<0.01$;3 与 2、4、5 各组比较,* $P<0.01$;2、4、5 各组间比较, $P>0.05$;E-cadherin:SW480,HCT116 和 HT29 中,1 与 2、3、4、5 各组比较,* $P<0.01$,2、3、4、5 各组间比较, $P>0.05$

2.3 Transwell 实验

2.3.1 Transwell 侵袭实验结果 各细胞系转染质粒 pTracer-CMV/BSD-Twist 组与其他组相比,侵袭细胞数目明显增多,差异有统计学意义($P<0.01$),表明上调 Twist 基因表达,细胞侵袭性增强;各细胞系转染质粒 pGenesil1.2-Twist-shRNA 组与其他组相比,侵袭细胞数目明显减少,差异有统计学意义($P<0.01$),这表明抑制 Twisit 基因表达,细胞侵袭性减弱(表 3,图 2)。

表 3 各组细胞系侵袭结果
Tab 3 Invasion result of each cell lines in each group

组别	侵袭细胞计数(个/HP)		
	SW480	HCT116	HT29
1	524.12±2.3	454.24±1.55	780.12±1.6
2	289.21±1.8	328.32±2.31	320.21±1.4
3	295.12±6.3	98.23±3.74	315.32±4.5
4	288.83±2.6	319.83±1.51	318.34±2.8
5	290.76±2.4	335.98±2.47	319.89±1.5
F	82.32	75.89	58.45
P	0.000	0.000	0.000

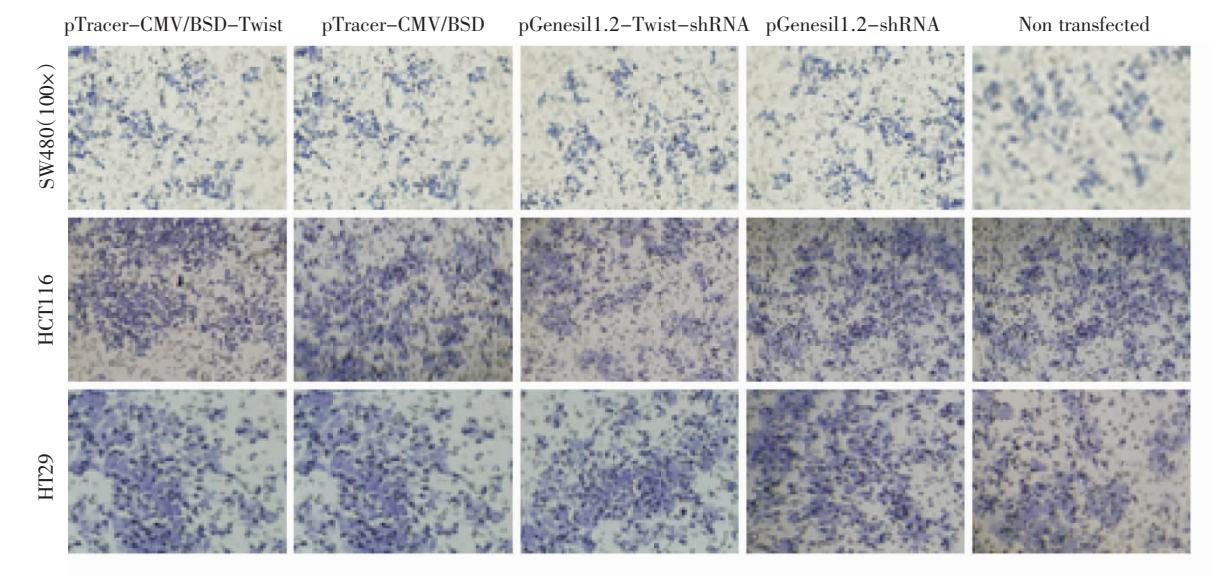


图 2 各组细胞系侵袭能力
Fig 2 The invasion ability of each cell lines in each group

2.3.2 Tanswell 迁移实验结果 各细胞系转染质粒 pTracer-CMV/BSD-Twist 组与其他组相比,迁移细胞数目明显增多,差异有统计学意义($P<0.01$),表明

上调 Twist 基因表达,细胞迁移能力增强;HCT116 转染质粒 pGenesil1.2-Twist-shRNA 组与其他组相比,侵袭细胞数目明显减少,差异有统计学意义

($P<0.01$),SW480 和 HT29 细胞系转染 pGenesil1.2-Twist-shRNA 后,迁移细胞数目差异不显著($P>0.05$), 这表明抑制 HCT116 细胞系中 Twisit 基因表达,细胞迁移能力减弱(图 3,表 4)。

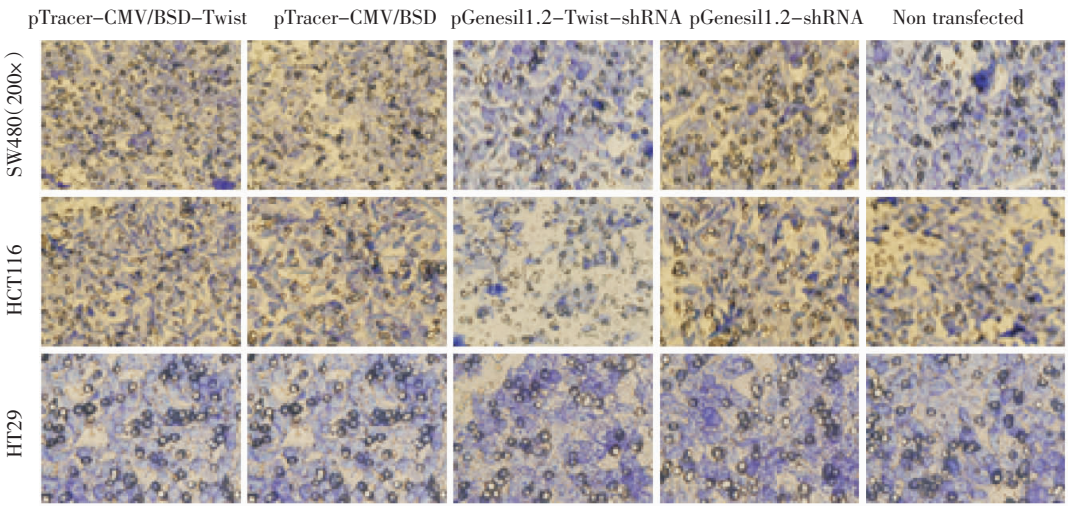


图 3 各组细胞系迁移能力
Fig 3 The migration ability of each cell lines in each group

表 4 各组细胞系迁移结果
Tab 4 The migration result of each cell lines in each group

组别	侵袭细胞计数(个/HP)		
	SW480	HCT116	HT29
1	1 380.21±1.13	1 245.45±1.43	2 320.32±1.10
2	978.22±1.32	985.22±1.05	1 020.23±1.76
3	979.43±1.42	521.76±1.85	1 058.54±1.54
4	984.65±1.12	978.65±1.65	1 052.23±1.34
5	998.54±1.32	996.21±1.32	1 047.76±1.65
F	68.22	56.48	78.34
P	0.000	0.000	0.000

3 讨论

结肠癌的发病是一个多因素、多步骤的过程,形成不同病理阶段的相应表型,这些因素主要包括内部原癌基因渐序突变激活、抑癌基因的失活及外部环境的影响等。目前结肠癌的治疗方案主要包括外科手术、化疗、放疗和生物治疗在内的综合治疗。但临床上,大多数结肠癌患者就诊时已处于中晚期,部分患者已经失去手术治疗机会,而且有些患者手术后很快发生复发与转移,对于这些患者目前还没有有效的治疗方案,而转移最终导致了结直肠癌患者的死亡。因此,探究肿瘤转移的机制及防治措施已成为当前改善结肠癌患者预后的关键所在,也是当前国内外肿瘤研究领域的热点话题。

恶性肿瘤最主要的特征之一是转移,肿瘤的转移是一个复杂的多级的生物学过程,而肿瘤细胞获得侵袭转移能力的关键一步便是 EMT^[10]。EMT 的主要特征是上皮细胞表型标记物的表达下调或缺失

(如 E-cadherin),而间质细胞表型标记物(如 Vimentin、N-cadherin 等)表达上调^[11-12]。调控 EMT 发生的分子机制目前仍不完全清楚,但 Twist 基因作为一种关键的转录调控因子,高表达 Twist 基因引发 EMT 而促进肿瘤侵袭转移的作用越来越引起人们的关注^[13]。目前研究认为, Twist 作为一种高度保守的转录因子,可能通过结合相应靶基因启动子上的 E-box 序列,从而抑制 E-cadherin 的表达,同时激活诸多间质细胞标记物的表达,从而促进 EMT。Gao 等^[14]的研究证实 Twist 基因可以通过下调 E-cadherin 的表达影响食管鳞状细胞癌的侵袭和转移能力; Ru 等^[15]发现胃癌细胞中 Twist 基因的高表达可以增强细胞侵袭性,导致预后不良。为进一步研究 Twist 基因对人结肠癌细胞的调控作用,本实验中,成功提取质粒并转染结肠癌细胞系后发现,调控 Twist 基因高表达后,间质表型标志物 Vimentin 表达水平显著升高,上皮表型标志物 E-cadherin 表达水平显著降低,差异具有统计学意义,这表明 Twist 基因表达水平升高后能够促进 EMT 分子事件的发生,并增强肿瘤细胞的迁移和侵袭能力;抑制 Twist 基因表达水平后,只有 HCT116 细胞中间质表型标志物 Vimentin 表达水平明显降低,上皮表型标志物 E-cadherin 无显著变化。Transwell 实验表明抑制 HCT116 细胞中 Twist 基因表达后,肿瘤细胞的侵袭性和迁移性明显减弱。

综上所述,随着对 Twisit 基因研究的深入, Twist 基因的激活和失活可能会成为判断肿瘤预后的重要因素,对 Twist 基因表达的调控可能会成为肿瘤