

Twist 基因介导肿瘤细胞耐药的研究进展

Progress in Twist gene mediated drug resistance of tumor cells

张煦 综述;孙晓红 审阅(南华大学附属南华医院 妇产科,湖南 衡阳 421000)

[摘要] Twist 属于高度保守的碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构的转录因子家族,在动物和人的胚胎发育、诱导细胞迁移以及组织塑形中起重要作用。Twist 基因具有癌基因特征,在多种恶性肿瘤中高表达,不仅参与肿瘤的发生、侵袭和转移,而且与肿瘤细胞产生耐药性密切相关。Twist 基因可以通过抗细胞凋亡、干扰抗微管类药物、诱发上皮-间质转型、诱导产生肿瘤干细胞样特性及影响肿瘤微环境等促使肿瘤细胞耐药,因此有望成为逆转肿瘤耐药的新靶点。

[关键词] Twist 基因;肿瘤;耐药;机制

[中图分类号] R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0561-04

恶性肿瘤是威胁人类健康最危险的疾病,化疗在恶性肿瘤中晚期治疗、转移或复发的治疗、新辅助化疗以及放疗增敏等方面发挥了重大的作用。但是肿瘤细胞对药物产生的耐药性严重影响了化疗药的临床效果。逆转肿瘤细胞的耐药性、提高其对化疗药物的敏感性对恶性肿瘤的治疗具有非常重要的意义。肿瘤发生和发展过程中的一些异常基因都有可能成为候选药物的作用靶点,用于恶性肿瘤的治疗和耐药性的逆转。胚胎发育基因 Twist 属于高度保守的碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构的转录因子家族,具有癌基因的特征,不仅参与肿瘤的发生、发展,而且能促进肿瘤细胞产生耐药性。本文重点就近年来 Twist 与肿瘤细胞耐药的关系及其可能的机制进行简要综述。

1 Twist 的结构及功能

1.1 Twist 的发现

Thisse 等^[1]在研究果蝇胚胎发育过程中首次发现 Twist 基因,因其突变后引起果蝇胚胎扭曲样变化而得名。随后, Twist 及其同类基因在许多生物中被鉴定,包括无脊椎动物水母、线虫、水蛭和文昌鱼以及脊椎动物青蛙、鸡、鱼类、鼠和人。

1.2 Twist 基因及蛋白的结构

在脊椎动物中,存在两个 Twist 基因: Twist1 和 Twist2(也称之为 demo-1)。人类 Twist 基因定位于染色体 7p21,含 2 个外显子和 1 个内含子。第 1 个外显子长 772 bp,包含整个编码区域;内含子长为 536 bp; Twist mRNA 全长 1 669 bp。第 1 个 ATG(+315)后面有一含 609 个碱基的连续开放性读码框(终止于 +922),该读码框包含密码子 TAG,并且覆

盖了第 1 个外显子。转录上游有 2 个 TATA 盒,分别定位于 -32 和 -110,在下游 3'末端有 2 个蛋白多腺苷酸化信号,定位于 +1 565 和 +1 915。

在不同种属之间, Twist 的核苷酸和氨基酸系列高度保守,能编码 bHLH DNA 结合的转录因子,能结合一种 E-box 的 DNA 序列: CANNTG。人 Twist 蛋白就是一个 bHLH 类型的转录因子,由 Twist 基因编码 202 个氨基酸,有 N 端、bHLH 域、C 端三个区域,并且通过分子中的 bHLH 与 DNA 上的 E-box 结合,进而形成同源或异源二聚体,调节靶基因的表达^[2]。

1.3 Twist 的功能

正常情况下, Twist 主要表达于胎盘、胚胎中胚层和成人的某些中胚层来源的未分化组织,在胚胎期幼稚中胚层细胞和中胚层起源器官中表达最多,出生后在成熟组织降至低水平。 Twist 在胚胎发育中起重要作用, Chip-on-chip 分析发现, Twist 通过调节 500 多个靶基因的表达,直接驱动了果蝇中胚层的发育^[3]。而 Twist 最初发现在胚胎发育过程中,通过促进上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),调节胚胎发育^[2]。 Twist 异常高表达可引起肿瘤,但在一些组织器官的发育过程中, Twist 表达减少也会引起不良后果,如胚胎期 Twist 基因的突变将导致原肠胚形成异常,形成非间叶层,并导致胚胎在终末阶段死亡^[4]。人类 Twist 基因的突变将会造成头盖骨连接常染色体显性失常,即塞-

[作者简介] 张煦(1986-),女,湖南省宁乡人,硕士生,主要从事妇科肿瘤方面的研究, E-mail: meredith18zx@163.com

[通信作者] 孙晓红(SUN Xiao-hong, corresponding author), E-mail: csxhtt@sina.com

科综合征(Saethre-Chotzen syndrome, SCS), 表现为四肢异常、头和颜面不对称, 以及颅缝融合不成熟等^[4]。另外, Twist 同其他转录因子一样, 在转录水平上调控其他多种基因的表达^[5]。

2 Twist 与肿瘤的发生、发展

Twist 作为一种新的肿瘤相关基因, 在肿瘤的发生、侵袭、转移等过程中发挥重要作用。它在多种恶性肿瘤中表达升高, 如乳腺癌、肺癌、食管癌、卵巢癌、宫颈癌、肝癌、膀胱癌、前列腺癌、胃癌, 以及鼻咽癌等, 而在正常组织和恶性程度低的癌细胞中并无或极低表达。Twist 可通过抑制细胞凋亡^[6]、抑制抑癌基因 p53^[7]、促进肿瘤血管生长^[8]等促进肿瘤的形成。EMT 是胚胎发生、慢性炎症和纤维化以及肿瘤进展中的一个重要过程, 其特征是失去上皮性的标记(如 E-钙黏蛋白), 而获得间质细胞的标记(如 N-钙黏蛋白等)^[9], 促进癌细胞侵袭和转移。Twist 作为 EMT 中的关键调控因子, 参与了肿瘤的侵袭、转移^[10], 它能识别 E-钙黏蛋白启动子上的 E-box 基序, 抑制其转录, 使 E-钙黏蛋白功能或表达下调, 导致无侵袭力的细胞获得侵袭力。

3 Twist 与肿瘤耐药

肿瘤耐药是一个复杂的、多因素介导的过程, 是肿瘤研究的热点领域。肿瘤耐药机制一般包括细胞表面药泵蛋白将药物外排、DNA 修复异常、胞内解毒系统的活化, 以及凋亡通路阻滞等。近年肿瘤干细胞的发现以及肿瘤微环境的研究进展为研究肿瘤耐药提供了新的思路。Twist 不仅在肿瘤的生长、转移和侵袭中起重要作用, 而且能促进肿瘤细胞产生耐药性。

3.1 Twist 抗细胞凋亡与肿瘤耐药

细胞增殖、凋亡失衡与人类多种肿瘤的发生、发展有重要关系。抗凋亡基因的过度表达和抑癌基因的过度抑制往往是肿瘤形成的前提条件。化疗中, 肿瘤细胞凋亡受抑制和产生耐药性存在必然的联系。Zhang 等^[11]通过对鼻咽癌细胞系中 Twist 基因的研究, 发现 Twist 通过 Akt 通路发挥抑制凋亡的作用, 介导 HNE-1 细胞对紫杉醇产生耐药。同时, Cheng 等^[12]也报道了在乳腺癌细胞株 MCF-7 中, Twist 可上调 Akt2 的表达, 抑制细胞凋亡, 增加 MCF-7 细胞对紫杉醇的抗药性; 并且还通过 Twist 基因敲除技术证实了 Akt2 是 Twist 基因下游靶点, 认为 Twist-Akt2 信号在增强乳腺癌细胞侵袭能力、存活能力及对抗癌药的抵抗中发挥重要作用。此外, Twist 在 NF- κ B 依赖的

化疗耐药中也起重要作用。Twist 作为保护 NF- κ B 抗凋亡功能的一个新的介质, 抑制 JNK、p53 和 p19ARF 信号通路转导和 Bcl-2 的磷酸化, 抵抗化疗药物引起的细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)^[13]。YB-1(Y-boxbindingprotein-1)作为 Twist 的靶基因之一, 具有抗肿瘤细胞凋亡的作用, 同时也是肿瘤细胞耐药的重要标志。化疗中, Twist 可通过调节 YB-1 的表达, 使肿瘤细胞对多柔比星产生耐药^[14]。Zhuo 等^[15]利用 RNA 干扰技术下调 Twist 的表达后, 发现肺癌 A549 细胞通过 MAPK/线粒体途径增加了对顺铂的敏感性。

3.2 Twist 促使对抗微管类化疗药物的耐药

抗微管类药物以细胞微管蛋白为作用靶点的药物, 分为紫杉烷类和长春花碱类, 它们通过抑制细胞的有丝分裂产生抗肿瘤活性。临床上, 抗微管类药物可用于多种肿瘤的治疗, 如卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌、肺癌、恶性黑色素瘤等。Hoek 等^[16]对大量黑色素瘤组织进行研究, 发现 Twist 的高表达与黑色素瘤的低存活率相关, 并推测高表达的 Twist 会导致黑色素瘤对紫杉醇和长春新碱产生抗药性。Kajiyama 等^[17]在上皮性卵巢癌中建立稳定的耐紫杉醇细胞系 TAOV-PR 和 SKOV-PR, 发现其 Twist 表达较亲代 TAOV 和 SKOV-3 细胞增强, 但是对其产生紫杉醇耐药的机制尚不清楚。Wang 等^[18]利用基因组杂交技术研究鼻咽癌细胞株 HNE1-T3, 结果发现 Twist 的表达上调与细胞对紫杉醇耐药有关。此外, 在鼻咽癌、膀胱癌、卵巢癌、前列腺癌细胞中 Twist 的表达增加还影响对另一种作用于微管的化疗药物长春新碱的耐药, 提示 Twist 基因的表达与紫杉醇和长春新碱对微管的作用有关, 导致肿瘤对于化疗药物的耐药。但是, Zhang 等^[11]研究却发现, 在鼻咽癌细胞中 Twist 介导的紫杉醇耐药可能是通过抗细胞凋亡, 而不是通过影响其有丝分裂。但 Twist 促使肿瘤细胞对抗微管类药物产生耐药现象是影响其有丝分裂还是发挥抗凋亡作用, 或者是通过其他途径还未阐明。

3.3 Twist 诱发 EMT 促进肿瘤耐药

EMT 是指具有极性的上皮细胞转换成具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的间充质细胞的过程。EMT 是肿瘤进展的重要步骤, 当恶性肿瘤细胞出现 EMT 时, 即可视为侵袭转移的开始。Twist 参与了 EMT 的全过程, 是其关键的调控因子^[11]。

目前认为 EMT 是“化学治疗敏感/耐药的开关”, 而肿瘤转移与发生耐药不是孤立事件, 两者之间可能存在着一种功能上的联系。有报道^[19]称, 编码 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的 *MDR1* 基因的

转录激活调节是通过促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路,而调节 EMT 发生的另一个转录因子 Snail 的转录激活也是通过 MAPK 通路^[5],且在果蝇中发现 Twist 可以激活 Snail 的表达,从而揭示了肿瘤转移与耐药的发生存在着相同的信号通路,两者常伴随出现。另外,Black 等^[20]将靶向 E-cad 的 siRNA 转染至上皮细胞癌 UM-UC14 细胞中,导致 E-cad 沉默而发生 EMT,且 UM-UC14 对上皮细胞生长因子抑制剂西妥昔单抗的敏感性显著降低。在乳腺癌 MCF-7 细胞中,Li 等^[21]发现,诱导 MCF-7 细胞发生 EMT 后,可促进其侵袭和 MDR 的发生;用 siRNA 下调 Twist 的表达可阻止 EMT 的发生,部分逆转 MDR,再用多柔比星处理,MCF-7 细胞的侵袭转移能力明显下降。David 等^[22]在膀胱癌中也发现,EMT 能促使肿瘤细胞产生耐药现象。最近,Saxena 等^[23]发现, Twist 诱导 EMT 发生后,可通过上调 ABC 转运子介导肿瘤细胞产生多药耐药,而 ABC 转运子与 MDR 密切相关,这为探讨 EMT 促使肿瘤耐药的机制提供了新的思路。

以上证据可以看出,发生转移的肿瘤具有更强的耐药性;而另一方面,具有耐药能力的癌细胞更容易发生扩散转移。Rho 等^[24]建立了耐吉非替尼的非小细胞肺癌 A549/GR 细胞,观察到上述 EMT 现象,并且发现 A549/GR 细胞在 Transwell 小室中的侵袭性及运动能力增强。此外,在建立的耐他莫昔芬乳腺癌 MCF-7 细胞和耐吉西他滨的胰腺癌细胞中均可观察到类似的 EMT 现象^[25-26]。由此可见,深入探讨 EMT 和肿瘤耐药的关系对肿瘤治疗具有重要的指导意义。

3.4 其他

最新文献^[27-29]报道, Twist 促使肿瘤细胞耐药还与肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)和肿瘤微环境有关。肿瘤干细胞是存在于肿瘤组织中的一小部分具有干细胞性质的细胞群体。肿瘤干细胞除具有无限的自我更新能力、分化潜能和高致瘤性外,还具有耐药性,因为其细胞膜上多数表达 ABC 家族膜转运蛋白。这类 ABC 蛋白大多可运输并外排包括代谢产物、药物、毒性物质、内源性脂类物质、多肽、核苷酸及固醇等多种物质,使之对化疗药物产生耐药^[30]。Li 等^[27]通过对乳腺癌 MCF-7 和宫颈癌 HeLa 细胞的研究,发现 Twist 过表达可引起 EMT 相关的形态学变化,并且使肿瘤细胞出现干细胞样特性,如肿瘤球形成、表达 ALDH1 和 CD44 等,并推测 Twist 诱发 EMT 后,肿瘤细胞产生耐药是由于肿瘤细胞具有了干细胞样特性。另外,Wu 等^[28]研究发现, Twist 能直接激活

Bmi1, Bmi1 可以维持自我更新和干细胞特性,这两个分子相互依存共同调控 EMT 和肿瘤干细胞样特性。此前已有报道^[31-33]证实, Bmi1 在不同肿瘤中能引起 5-FU 和多西他赛耐药以及放疗抵抗。

肿瘤微环境包括细胞因子、生长因子、激素和细胞外基质等多种成分。它是肿瘤与宿主之间相互作用的环境,在介导肿瘤细胞耐药和抵抗细胞死亡中发挥了重要作用。肿瘤微环境中特殊的“生态位”可能为肿瘤细胞提供了一个“避难所”,即在最初暴露于化疗药物之后提供了一种生存优势,它促进了肿瘤获得性耐药的发生。最近, Kim 等^[29]研究了肿瘤微环境中星形细胞与肿瘤细胞、宿主因素之间的相互关系,发现星形细胞能上调肿瘤细胞中 *GSTA5*, *BCL2L1* 和 *TWIST1* 等基因的表达,增加肿瘤细胞对化疗药的耐药性;进一步研究发现,基因表达上调和耐药依赖于星形细胞与肿瘤细胞之间通过缝隙接合部的接触;而通过 siRNA 下调这些基因后导致了化疗增敏。目前 Twist 产生肿瘤耐药现象与肿瘤干细胞和肿瘤微环境关系的研究还处于初步阶段,其具体机制和途径还有待进一步研究。

4 结 语

肿瘤耐药极大地影响了肿瘤临床化疗的疗效,解决耐药这一难题已经刻不容缓。胚胎发育基因 Twist 与肿瘤耐药密切相关,可考虑将 Twist 抑制剂与化疗药物联合应用以逆转肿瘤细胞的耐药性,但相关研究还有待更进一步深入,如 Twist 是否还参与了其他途径介导的细胞耐药,是否还与其他耐药相关基因联合发挥作用,以及如何制备相关单克隆抗体应用于临床等。总之,对 Twist 基因的深入研究将为逆转肿瘤细胞耐药提供新的思路 and 方向。

[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]. *EMB J*, 1988, 7(7): 2175-2183.
- [2] Castanon I, Baylies MK. A Twist in fate: Evolutionary comparison of Twist structure and function [J]. *Gene*, 2002, 287(1/2): 11-22.
- [3] Sandmann T, Girardot C, Brehme M, et al. A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(4): 436-449.
- [4] Schröder R. Vasa mRNA accumulates at the posterior pole during blastoderm formation in the flour beetle *Tribolium castaneum* [J]. *Dev Genes Evol*, 2006, 216(5): 277-283.
- [5] 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.
- [6] Feng MY, Wang K, Song HT, et al. Metastasis-induction and apoptosis-protection by Twist in gastric cancer cells [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26(8): 1013-1023.
- [7] Vichalkovski A, Gresko E, Hess D, et al. PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage [J]. *Oncogene*, 2010, 29(24): 3554-3565.
- [8] 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.
- [9] Foroni C, Broggini M, Generali D, et al. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact [J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(6): 689-697.
- [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] Zhang X, Wang Q, Ling MT, et al. Anti-apoptotic role of Twist and its association with Akt pathway in mediating taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(9): 1891-1898.
- [12] Cheng GZ, Chan J, Wang Q, et al. Twist transcriptionally upregulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(5): 1979-1987.
- [13] Pham GC, Bubici C, Zazzeroni F, et al. Upregulation of Twist-1 by NF- κ B blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(11): 3920-3935.
- [14] Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, et al. P300/CBP-associated factor regulates Y-box bindingprotein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(8): 1797-1806.
- [15] Zhuo WL, Wang Y, Zhuo XL, et al. Short interfering RNA directed against Twist, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 369(4): 1098-1102.
- [16] Hoek K, Rimm DL, Williams KR, et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5270-5282.
- [17] Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, et al. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(2): 277-283.
- [18] Wang X, Ling MT, Guan XY, et al. Identification of a novel function of Twist, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23(2): 474-482.
- [19] Shen H, Xu W, Luo W, et al. Upregulation of MDR1 gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma [J]. *Exp Hematol*, 2011, 39(5): 558-569.
- [20] Black PC, Brown GA, Inamoto T, et al. Sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitor requires E-cadherin expression in urothelial carcinoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(5): 1478-1486.
- [21] Li QQ, Xu JD, Wang WJ, et al. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(8): 2657-2665.
- [22] McConkey DJ, Choi W, Marquis L, et al. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(3/4): 335-344.
- [23] Saxena M, Stephens M, Pathak H, et al. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2: e179.
- [24] Rho JK, Choi YJ, Lee JK, et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line [J]. *Lung Cancer*, 2009, 63(2): 219-226.
- [25] Hiscox S, Jiang WG, Obermeier K, et al. Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(2): 290-301.
- [26] Shah AN, Summy JM, Zhang J, et al. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells [J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(12): 3629-3637.
- [27] Li J, Zhou BP. Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 49-60.
- [28] Wu KJ. Direct Activation of Bmi1 by Twist1: Implications in cancer stemness, epithelial-mesenchymal transition, and clinical significance [J]. *Chang Gung Med J*, 2011, 34(3): 229-238.
- [29] Kim SJ, Kim JS, Park ES, et al. Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy [J]. *Neoplasia*, 2011, 13(3): 286-298.
- [30] Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: The cancer stem cell hypothesis [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(8): 872-877.
- [31] Crea F, Duhagon Serrat MA, Hurt EM, et al. Bmi1 silencing enhances docetaxel activity and impairs antioxidant response in prostate cancer [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(8): 1946-1954.
- [32] Alajez NM, Shi W, Hui AB, et al. Targeted depletion of BMI1 sensitizes tumor cells to P53-mediated apoptosis in response to radiation therapy [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(11): 1469-1479.
- [33] Qin L, Zhang X, Zhang L, et al. Downregulation of BMI-1 enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(3): 531-535.

[收稿日期] 2012 - 05 - 17

[修回日期] 2012 - 07 - 24

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳