

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.003

Twist-1 基因在髓系白血病细胞中的表达及其作用

牟雅堃, 王楠, 郭丹, 赵杨杨, 刘晓燕, 董成亚, 王淑为, 王琳, 任倩, 马小彤(中国医学科学院暨协和医科大学 血液病医院暨血液学研究所 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

[摘要] **目的:** 检测 *Twist-1* 基因在白血病患者和造血系统恶性肿瘤细胞系中的表达情况, 并探讨其高表达对髓系白血病细胞增殖和凋亡的影响。**方法:** 用 Real-time PCR 检测急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphoid leukemia, ALL)、慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者和正常人的骨髓单个核细胞对照以及造血系统恶性肿瘤细胞系中 *Twist-1* mRNA 表达情况。构建 *Twist-1* 过表达及干扰载体, 制备慢病毒并感染髓系白血病细胞系 K562、U937、KG-1a, 通过细胞计数实验、集落形成实验、流式细胞术、Annexin V/PI 方法评价 *Twist-1* 对白血病细胞增殖、集落形成能力、周期、凋亡的影响。**结果:** *Twist-1* 在 AML 及 CML 患者中的表达水平显著高于对照(均 $P < 0.05$), 而 ALL 患者与对照组没有显著差异($P > 0.05$)。在 K562、U937、KG-1a 中过表达及干扰实验证实, *Twist-1* 高表达促进肿瘤细胞增殖、集落形成并抑制细胞凋亡; 干扰 *Twist-1* 表达则效果相反。**结论:** *Twist-1* 高表达于 AML、CML 髓系白血病细胞, 并促进白血病细胞的增殖和抑制凋亡。

[关键词] *Twist-1* 基因; 髓系白血病; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R733.7; R730.59

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)02-0168-07

Expression and function of *Twist-1* gene in myeloid leukemia cells

MOU Yakun, WANG Nan, GUO Dan, ZHAO Yangyang, LIU Xiaoyan, DONG Chengya, WANG Shuwei, WANG Lin, REN Qian, MA Xiaotong(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Hospital of Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of *Twist-1* gene in patients with leukemia and tumor cell lines of hematopoietic system and to discuss the effect of its overexpression on proliferation and apoptosis of myeloid leukemic cells. **Methods:** Expressions of *Twist-1* mRNA of hematopoietic tumor cell lines and PBMCs in patients with acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoid leukemia (ALL) or chronic myeloid leukemia (CML) as well as in normal healthy human were detected by Real-time PCR. Lentiviral vector for overexpression of *Twist-1* (pCDH1-Twist-1) were constructed and transduced into myeloid leukemic K562, U937 and KG-1a cell lines. Effect of *Twist-1* on proliferation, colony forming, cell cycle and apoptosis of the leukemic cells was evaluated by cell counting, colony forming, flow cytometry and Annexin V/PI assays. **Results:** Expressions of *Twist-1* in patients with AML and CML were significantly higher than that in control group (all $P < 0.05$), but there was no significant difference between all patients group and control group ($P > 0.05$). The overexpression and interference analyses demonstrated that overexpression of *Twist-1* in myeloid leukemic K562, U937 and KG-1a cell lines promoted proliferation and colony formation of the tumor cells, and inhibited apoptosis of the cells. However, interfering expression of *Twist-1* had the opposite effect. **Conclusion:** *Twist-1* was overexpressed in myeloid leukemic K562, U937 and KG-1a cell lines and its overexpression could promote proliferation of the leukemia cells and inhibit their apoptosis.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81270634, 81470278);天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(青年项目)(No. 15JCQNJC10300);协和青年科研基金滚动自助项目(No. 33320140066)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81270634, 81470278), the Youth Program of Applied Basic Research Foundation of Tianjin (No. 15JCQNJC10300), and the Science-Technology Foundation for Young Scientists of Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College (No. 33320140066)

[作者简介] 牟雅堃(1989 -),女,山东省潍坊市人,硕士生,主要从事白血病发生机制的研究, E-mail: mouyakun1989@163.com

[通信作者] 马小彤(MA Xiaotong, corresponding author), E-mail: ma_xt@aliyun.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160331.2005.006.html>

[**Key words**] *Twist-1* gene; myeloid leukemia; cell proliferation; cell apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(2): 168-174. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.003]

Twist-1 属于碱性螺旋-环-螺旋蛋白家族中高度保守的转录因子,在胚胎发生发展中起重要作用^[1-2]。近年研究^[3-5]认为,*Twist-1* 是癌基因,在很多实体肿瘤中高表达,可作为预后判断指标,并与癌症恶变、组织学分级有关。*Twist-1* 的主要作用包括促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡^[6-7],促进肿瘤的上皮间充质转换以及浸润、侵袭^[8-9]。虽然 *Twist-1* 在实体肿瘤中的作用一直是研究热点^[10-12],但到目前为止,*Twist-1* 与白血病的关系研究尚少。Li 等^[13]报道,在骨髓增生异常综合征中,*Twist-1* 发挥抗凋亡作用。本研究检测 *Twist-1* 在各类白血病患者和常见造血系统恶性肿瘤细胞系的表达情况,发现其高表达于急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)、慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者骨髓单个核细胞及髓系白血病细胞系。为明确 *Twist-1* 在白血病细胞中发挥的作用,构建 *Twist-1* 过表达和干扰慢病毒载体并感染髓系白血病细胞系,观察其对白血病细胞增殖、集落形成、周期、凋亡等生物学功能的影响,为阐明髓系白血病的发生机制提供新线索。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2005 年 1 月至 2008 年 12 月在中国医学科学院血液病医院就诊并初次诊断为 AML、急性淋巴细胞白血病(acute lymphoid leukemia, ALL)及 CML 患者的骨髓标本共 199 例,其中 AML 103 例、ALL 37 例、CML 59 例,所有患者均经过 MICM 综合确诊,诊断标准参照《血液病诊断及疗效标准》^[14]。入选患者男性 120 例、女性 79 例,年龄 14~78 岁,中位年龄 40 岁。对照组为同期 29 例骨髓象大致正常的健康人骨髓标本。

1.2 主要材料和试剂

过表达慢病毒载体 pCDH1、包装质粒 pPACKH1-GAG、pPACKH1-REV 及 pVSV-G 购于 SBI 公司。shRNA 特异慢病毒载体 pLL3.7、包装质粒 pMDL、RSV-Rev 购自 Addgene 公司。胎牛血清、TRIzol 试剂、RPMI 1640 和 DMEM 培养液均购自美国 Gibco 公司;SYBRgreen PCR kit、*EcoR* I、*Not* I、*Xho* I 和 *Hpa* I 限制性内切酶以及相关缓冲液均购自日本 TaKaRa 公司;兔抗人 *Twist-1* 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司,鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购

自美国 Sigma 公司;Annexin-V-Alexa Fluor647/碘化丙啶(PI)试剂盒购于美国 BD 公司;所有引物均由华大基因公司合成。

1.3 细胞株与细胞培养

髓系白血病细胞系 K562、U937、HL-60、KG-1a、NB4、J6-1,淋系白血病或淋巴瘤细胞系 Namalwa、CEM、Jurkat、Romas,人脑胶质瘤细胞系 U251 以及用于病毒包装的人胚肾细胞系 HEK 293T 均由本实验室保存。

细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640(HEK 293T 细胞用 DMEM),置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的条件下培养,取对数生长期细胞进行检测。

1.4 载体的设计、构建

1.4.1 过表达 *Twist-1* 重组慢病毒载体 根据人 *Twist-1* 基因 CDS 序列设计 PCR 引物,具体序列见表 1。以 KG-1a 细胞 cDNA 为模板,PCR 扩增 *Twist-1* 基因,1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收 PCR 产物。以 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切 PCR 回收产物和 pCDH1 载体构建过表达 *Twist-1* 重组慢病毒载体 pCDH1-*Twist-1*。

表 1 PCR 引物的寡核苷酸序列

Tab.1 Oligonucleotide sequences for PCR

Gene		Oligonucleotide sequence (5'-3')
<i>Twist-1</i>	F	CGCGAATTCGCCACCGTC
	R	CGCAGTCTTACGAGGAG
	F	CCGGCGCCGCTGGAG
	R	GACCTGGTAGAGGAA
<i>shTwist-1A</i>	F	CGATGGCAAGCTGCAGCTAT
	R	ATAGCTGCAGCTTGCCATCG
<i>shTwist-1B</i>	F	GGCTGAGCAAGATTCAGACC
	R	GGTCTGAATCTTGCTCAGC
<i>shScrA</i>	F	ATGCGAGACGTACGCATTC
	R	CAATGCGTACGTCTCGCAT
<i>shScrB</i>	F	ATGCTACTAGACGCCAACC
	R	CGTTCGCGTCTAGTAGCAT
<i>Twist-1^a</i>	F	GTCCGCAGTCTTACGAGGAG
	R	TGGAGACCTGGTAGAGGAA
<i>GAPDH^a</i>	F	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	R	GAAGATGGTGATGGGATTTTC

F: Forward primer; R: Reverse primer; a: Primers for Real-time PCR

1.4.2 *Twist-1* 干扰载体 在线设计 *Twist-1* 基因特异性干扰序列(shTwist-1A、shTwist-1B)及阴性对照序列(shScrA、shScrB), 具体序列见表 1。根据 pLL3.7shRNA 载体构建指南构建重组质粒。经测序证实序列正确。

1.5 病毒制备和感染

将载体质粒与辅助质粒通过脂质体法共转染 HEK 293T 细胞, 包装慢病毒。48 及 72 h 后收集病毒上清并浓缩。有限稀释法测定病毒滴度, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

将 *Twist-1* 过表达病毒(pCDH1-*Twist-1*)感染 K562、U937 细胞, 同时以空载体病毒(pCDH1-vector)感染相同细胞作为对照。

用含有 *Twist-1* 基因特异性干扰序列的 pLL3.7-shTwist-1(A、B)感染 K562、U937、KG-1a 细胞, 同时以含有随机对照序列的 pLL3.7-shScr(A、B)感染相同细胞作为对照。

感染 48 h 后, 流式细胞仪分选 GFP⁺ 细胞, 以 GFP⁺ 细胞阳性率代表感染效率。感染成功后, 采用 Real-time PCR 和 Western blotting 检测细胞内 *Twist-1* 的表达水平, 以验证过表达和干扰效果。

1.6 Real-time PCR 检测 *Twist-1* 基因的表达

收集白血病患者骨髓单个核细胞、造血系统恶性肿瘤细胞系细胞, 以高表达 *Twist-1* 的人脑胶质瘤细胞系 U251 作为阳性对照, 利用 TRIzol 试剂提取 RNA, 测定 RNA 浓度, 并反转录合成 cDNA, 以 *GAPDH* 作为内参, Real-time PCR 检测 *Twist-1* 基因的表达(具体序列见表 1)。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算均值作为相对表达量。

1.7 Western blotting 检测 *Twist-1* 蛋白的表达

收集白血病患者骨髓单个核细胞、造血系统恶性肿瘤细胞系(病毒感染前、后)细胞, 以 U251 细胞作为阳性对照, 加入含蛋白酶抑制剂的裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, SDS-PAGE 并转移蛋白到 NC 膜。依次加入一抗(兔抗人 *Twist-1* 多抗, 1:750 稀释; 鼠抗人 β -actin 单抗, 1:3 000 稀释)、脱脂奶粉封闭、二抗(HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG, 均按 1:3 000 稀释), HRP-ECL 显影。

1.8 观察 *Twist-1* 表达对肿瘤细胞增殖能力的影响

将病毒感染前后的 K562、U937 及 KG-1a 细胞以 $1 \times 10^4/\text{ml}$ (U937 为 $1 \times 10^5/\text{ml}$) 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μl , 各设 3 个复孔, 每天计数孔内细胞, 共计数 7 d, 取 3 孔的均值绘制生长曲线。

1.9 观察 *Twist-1* 对肿瘤细胞集落形成能力的影响

将 $2 \times 10^2/\text{ml}$ 病毒感染前后的细胞悬液加入集

落培养体系, 接种于平底 96 孔板中培养 14 d。大于 50 个细胞的细胞丛为一集落, 计数各孔的集落数。

1.10 流式细胞术检测 *Twist-1* 表达对肿瘤细胞周期和凋亡的影响

取病毒感染前后的细胞, 每 1×10^6 个细胞加入 70% 冰乙醇 1 ml, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h, 离心弃上清, 加 RNase A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 室温孵育 15 min 后加 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI, 避光室温孵育 30 min, 流式细胞术检测细胞周期。同时, 按照 BD 公司 Annexin-V-Alexa Fluor647/PI 凋亡检测试剂盒说明操作, 检测病毒感染前后细胞的凋亡。

1.11 统计学处理

应用 SPSS 22 软件分析数据, 正态计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 *t* 检验; 非正态分布计量资料以中位数(全距)表示, 两组间比较采用两独立样本比较的秩和检验(Mann-Whitney, *U* 检验)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Twist-1* 在髓系白血病细胞系中高表达

Real-time PCR 方法和 Western blotting 检测髓系白血病细胞系(K562、U937、HL-60、KG-1a、NB4、J6-1)和淋系白血病或淋巴瘤细胞系(Namalwa、CEM、Jurkat、Romas)中 *Twist-1* 的 mRNA 和蛋白的表达, 以高表达 *Twist-1* 的人脑胶质瘤细胞系 U251 作为阳性对照, 结果(图 1)显示, *Twist-1* 在髓系白血病细胞系中高表达, 显著高于淋系细胞系($P = 0.04$)。

2.2 *Twist-1* 在白血病患者中的表达情况

Real-time PCR 检测结果数据经秩和检验分析显示, 与正常对照相比, AML 及 CML 患者 *Twist-1* 表达显著升高(均 $P < 0.05$), 而 ALL 组与对照组表达差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 2)。进一步分析 *Twist-1* 表达水平和髓系白血病患者临床特征的关系, 结果发现 *Twist-1* mRNA 表达水平与患者性别、年龄、是否表达 CD34 抗原、髓外浸润、外周血白细胞计数均无明显的相关性(资料未出示)。

2.3 过表达 *Twist-1* 对髓系白血病细胞的影响

2.3.1 构建的 *Twist-1* 过表达病毒载体感染细胞的验证 慢病毒颗粒感染 K562、U937 细胞, 感染效率分别为 K562-*Twist-1*: (91.32 ± 3.72)%, K562-Vector: (93.31 ± 2.05)%, U937-*Twist-1*: (70.60 ± 4.23)%, U937-Vector: (72.75 ± 3.23)%。Real-time PCR 检测 *Twist-1* mRNA 表达, 结果显示 K562、U937 过表达组(*Twist-1*)较对照组(Vector) *Twist-1*

mRNA 相对表达水平上升约 240 倍; Western blotting 检测显示过表达组 *Twist-1* 蛋白相对表达水平较对

照组显著上升, 提示本研究设计的 *Twist-1* 过表达慢病毒感染能有效增加目的基因的表达。

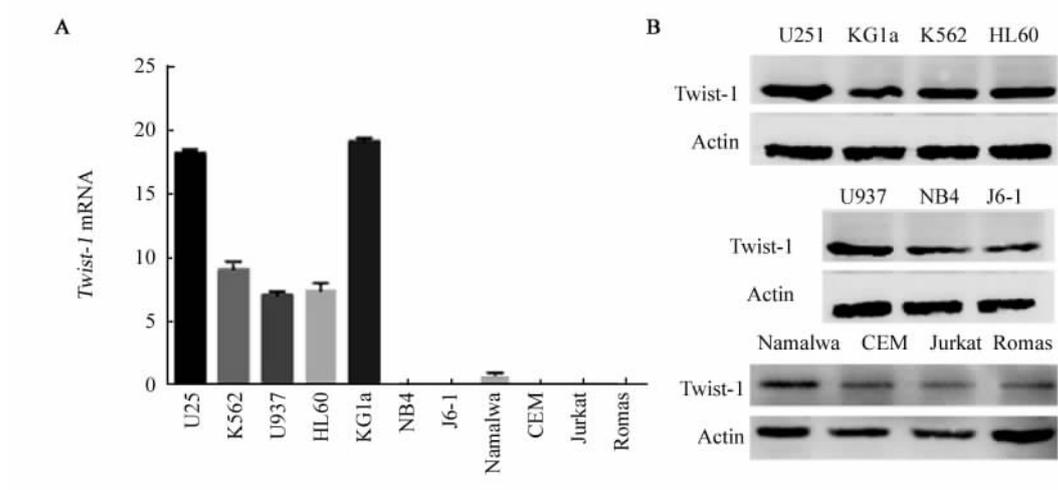


图 1 *Twist-1* 在白血病细胞系中的表达情况

Fig. 1 Relative expression of *Twist-1* in hematopoietic malignant cell lines

A: The expression levels of *Twist-1* mRNA were detected by Real-time PCR; B: The protein expression levels of *Twist-1* were determined by Western blotting, β -Actin was shown as internal loading control

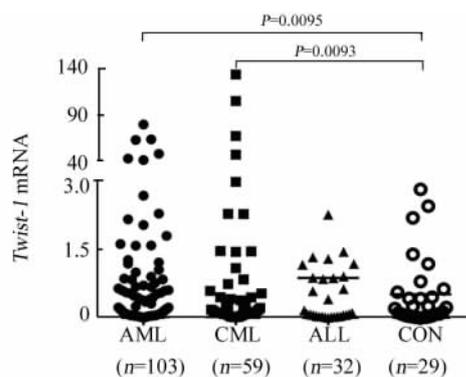


图 2 Real-time PCR 检测 *Twist-1* mRNA 在白血病患者中的表达情况

Fig. 2 *Twist-1* mRNA expression in BMMNCs from patients with leukemia, as determined by Real-time PCR

2.3.2 过表达 *Twist-1* 对髓系白血病细胞增殖、集落形成、周期、凋亡的影响 细胞增殖(图 3)及集落形成(图 4)实验中, K562-*Twist-1*、U937-*Twist-1* 的细胞增殖、集落形成数均显著高于空载体对照组 ($P < 0.05$)。流式术检测细胞周期结果(图 5)显示, 过表达 *Twist-1* 使 U937 细胞 S 期比例增加 ($P < 0.05$), 而对 K562 无明显影响。此外, 过表达 *Twist-1* 对 K562 和 U937 细胞的凋亡无显著影响 ($P > 0.05$, 资料未出示)。

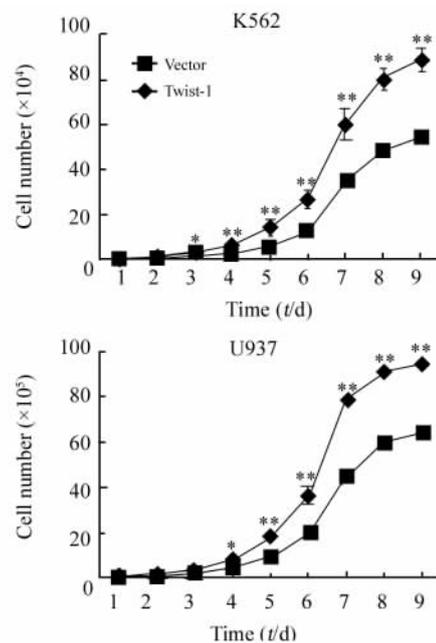


图 3 过表达 *Twist-1* 促进 K562 及 U937 细胞增殖
Fig. 3 *Twist-1* overexpression promoted proliferation of K562 and U937 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vector control group

2.4 干扰 *Twist-1* 对髓系白血病细胞生物学功能的影响

2.4.1 构建的 *Twist-1* 干扰载体干扰效率的验证

Real-time PCR 及 Western blotting 检测慢病毒感染的

K562 细胞中 *Twist-1* 的干扰效率, 结果显示干扰组 (sh*Twist-1*) 较对照组 (shScr) 的 *Twist-1* 基因相对表达水平分别下降了 (64.35 ± 2.33)%、(62.56 ± 0.87)%, 蛋白相对表达水平亦较对照组显著下降。

形成、周期、凋亡的影响 *Twist-1* 敲降后抑制了 K562、U937 和 KG-1a 细胞增殖 (图 6), 也显著降低了 K562 细胞所形成集落数 ($P < 0.05$, 图 7)。

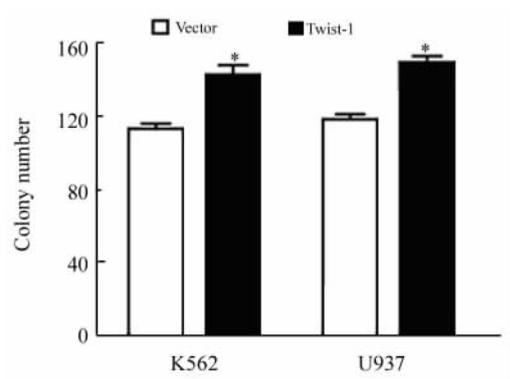


图 4 过表达 *Twist-1* 促进 K562 及 U937 细胞集落形成

Fig. 4 Overexpression of *Twist-1* promoted colony formation of U937 and K562 cells

* $P < 0.05$ vs vector control group

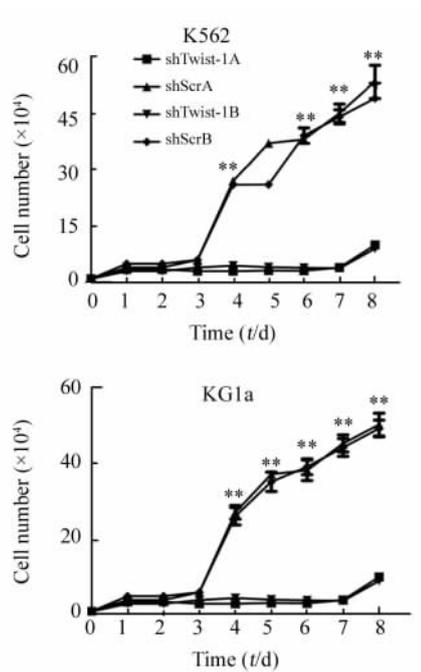


图 6 敲降 *Twist-1* 抑制 K562 及 KG-1a 细胞增殖

Fig. 6 Knockdown of *Twist-1* inhibited cell growth in both K562 and KG-1a cells

** $P < 0.01$ vs shScr control group

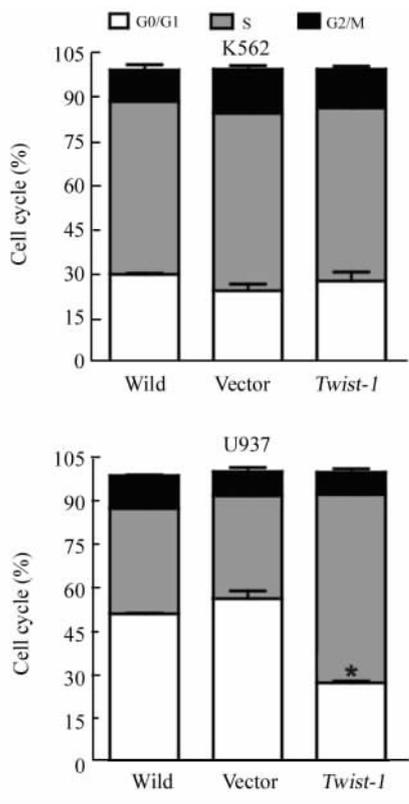


图 5 过表达 *Twist-1* 对 K562 及 U937 细胞周期的影响

Fig. 5 Effect of *Twist-1* overexpression on cell cycle of K562 and U937 cells

* $P < 0.05$ vs wild and vector control group

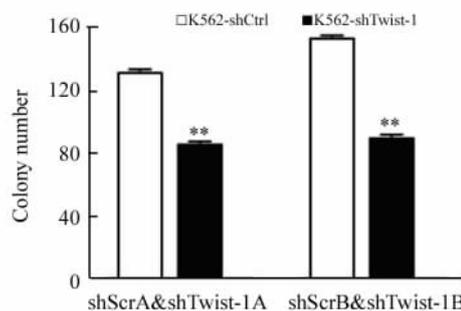


图 7 *Twist-1* 表达降低抑制 K562 细胞集落形成

Fig. 7 Down-expression of *Twist-1* inhibited clone formation of K562 cells

A: shScrA&shTwist-1A; B shScrB&shTwist-1B

** $P < 0.01$ vs shScr control group

2.4.2 干扰 *Twist-1* 对髓系白血病细胞增殖、集落

尽管干扰 *Twist-1* 对 K562 细胞周期的影响没有统计学差异 (图 8A), 但可诱导 U937 细胞阻滞于 G1 期 (图 8B), 提示 *Twist-1* 对细胞周期影响呈现细胞类型依赖性特征。流式术检测结果 (图 9) 显示, 感染 sh*Twist-1* 后的 K562 细胞凋亡显著增加

($P < 0.05$), 表明 *Twist-1* 对白血病细胞增殖能力有重要作用。而干扰 *Twist-1* 对 U937 细胞凋亡无明显影响($P > 0.05$, 资料未出示)。

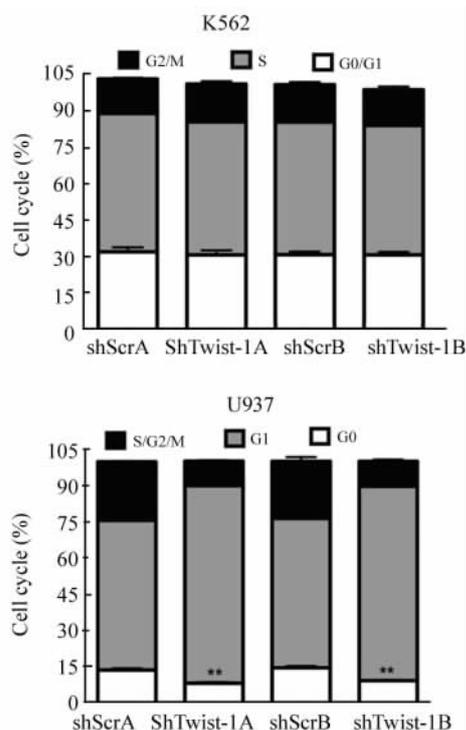


图 8 敲降 *Twist-1* 对 K562 及 U937 细胞周期的影响

Fig. 8 Effect of *Twist-1* knockdown on cell cycle of K562 and U937 cells

** $P < 0.01$ vs shScr control group

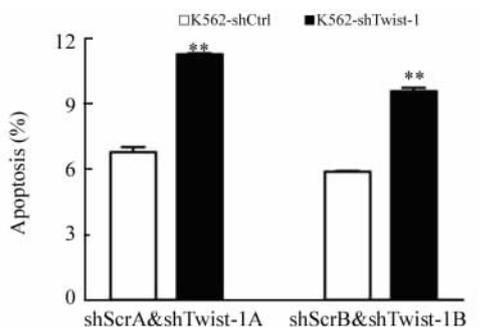


图 9 敲降 *Twist-1* 促进 k562 细胞凋亡

Fig. 9 knockdown of *Twist-1* promoted the apoptosis of K562 cells

3 讨论

白血病是由造血干/祖细胞获得性的累积性基因改变导致正常的细胞生长、增殖和分化发生紊乱的一种恶性疾病,在遗传学上具有高度异质性,分类复杂。

其中,AML 是临床表现和预后均具有较大差异的恶性克隆性肿瘤^[15-16],CML 是一种存在 BCR-ABL 酪氨酸激酶活性活性的造血干细胞疾病^[17]。尽管随着研究的不断深入,白血病的治疗手段越来越多,完全缓解率有了很大改善,但除个别类型的发生机制及相关治疗取得显著进展外,大多数患者仍会复发并最终导致死亡^[18]。因此,进一步寻找调控白血病发生的新的相关基因,对于阐明白血病的发生机制,开发有效的新的治疗靶点具有重要意义^[19-20]。

Twist-1 基因的表达改变在实体肿瘤中报道较多,并与肿瘤的发生发展有密切关系。然而,关于 *Twist-1* 在白血病中作用的研究很少。本研究表明, *Twist-1* 在 AML 和 CML 患者的骨髓单个核细胞中高表达,而在 ALL 患者中的表达水平与对照组无差异;且在常见白血病细胞系中, *Twist-1* 在髓系细胞系中表达较淋系细胞系高,提示 *Twist-1* 可能在髓系白血病中起重要作用。本研究成功构建 *Twist-1* 过表达和干扰载体,感染髓系白血病细胞系,观察其对白血病细胞增殖、集落形成、周期、凋亡等生物学功能的影响。发现 *Twist-1* 过表达促进 K562 及 U937 细胞生长、集落形成;而在髓系白血病细胞中干扰 *Twist-1* 则抑制细胞增殖、集落形成,并显著诱导白血病细胞凋亡。其中,干扰 *Twist-1* 表达对 K562 细胞周期不显著,但可诱导 U937 细胞阻滞于 G1 期;同时,感染 shTwist-1 后的 K562 细胞凋亡显著增加,而 U937 细胞凋亡没有明显变化,提示 *Twist-1* 对细胞周期和凋亡的影响可能具有细胞类型依赖性特征,但仍需进一步研究。本文首次揭示,除实体瘤外, *Twist-1* 也参与造血系统恶性肿瘤的发生发展。此外,有文献^[21]报道,在实体瘤中 *Twist-1* 高表达与肿瘤细胞耐药相关,本课题组拟进一步探索 *Twist-1* 在白血病细胞耐药中的作用。

总之,本研究首次发现 *Twist-1* 高表达于 AML、CML 患者骨髓单个核细胞,并证实 *Twist-1* 高表达有利于 AML、CML 髓系白血病细胞的增殖。本研究提示 *Twist-1* 可能参与髓系白血病的发生和发展进程,为阐明白血病的发病机制探讨提供了新线索,其作用机制待进一步研究。

[参考文献]

[1] THISSE B, MESSAL M, PERRIN-SCHMITT F. The twist gene: isolation of a Drosophila zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern [J]. Nucleic Acids Res, 1987, 15 (8): 3439-3453. DOI : 10.1093/nar/15.8.3439.
 [2] Massari M E, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms [J]. Mol Cell Biol, 2000,

- 20(2): 429-440. DOI : 10.1128/mcb.20.2.429-440.2000.
- [3] YANG J, MANI S A, DONAHER J L, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis [J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939. DOI : 10.1016/j.cell.2004.06.006.
- [4] QIN Q, XU Y, HE T, et al. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 90-106. DOI : 10.1038/cr.2011.144.
- [5] ANSIEAU S, MOREL A P, HINKAL G, et al. TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein [J]. *Oncogene*, 2010, 29(22): 3173-3184. DOI : 10.1038/onc.2010.92.
- [6] ECKERT M A, LWIN T M, CHANG A T, et al. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(3): 372-386. DOI : 10.1016/j.ccr.2011.01.036.
- [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 [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12): 5153-5162. DOI : 10.1158/0008-5472.can-04-3785.
- [8] JUNG H Y, JING Y. Unraveling the TWIST between EMT and cancer stemness [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(1): 1-2. DOI : 10.1016/j.stem.2014.12.005.
- [9] KANG Y, MASSAGUE J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis [J]. *Cell*, 2004, 118(3): 277-279. DOI : 10.1016/j.cell.2004.07.011.
- [10] BECK B, LAPOUGE G, RORIVE S, et al. Different levels of Twist1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression. [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(1): 67-79. DOI : 10.1016/j.stem.2014.12.002.
- [11] LIANG Y, HU J, LI J, et al. Epigenetic activation of Twist1 by MTDH promotes cancer stem-like cell traits in breast cancer. [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(17): 3672-3680. DOI : 10.1158/0008-5472.CAN-15-0930.
- [12] BURNS T F, DOBROMILSKAYA I, MURPHY S C, et al. Inhibition of TWIST1 leads to activation of oncogene-induced senescence in oncogene-driven non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(4): 329-338. DOI : 10.1158/1541-7786.mcr-12-0456.
- [13] LI X, MARCONDES A M, GOOLEY T A, et al. The helix-loop-helix transcription factor TWIST is dysregulated in myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2010, 116(13): 2304-2314. DOI : 10.1182/blood-2009-09-242313.
- [14] 张之南. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社. 2007:103-138.
- [15] DÖHNER H, WEISDORF D J, BLOOMFIELD C D. Acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(12): 1136-1152. DOI : 10.1056/nejmra1406184.
- [16] 李凌浩, 王智, 张日. p53 与急性髓细胞白血病相关研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(5): 668-672. DOI : 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.020.
- [17] APPERLEY J F. Chronic myeloid leukaemia [J]. *Lancet*, 2015, 385(9976): 1447-1459. DOI : 10.1016/S0140-6736(13)61210-0.
- [18] JOSEPHINE M E. Targeting stem cells in chronic myeloid leukemia with a PPAR- γ agonist [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373:1973-1975. DOI : 10.1056/nejmcibr1511276.
- [19] RADICH J. Structure, function, and resistance in chronic myeloid leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(3): 305-306. DOI : 10.1016/j.ccr.2014.08.010.
- [20] LEYUAN M, YI S, ROBERT B, et al. A therapeutically targetable mechanism of BCR-ABL-independent imatinib resistance in chronic myeloid leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(252): 4531-4536. DOI : 10.1126/scitranslmed.3009073.
- [21] VESUNA F, LISOK A, KIMBLE B, et al. Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by downregulating estrogen receptor- α [J]. *Oncogene*, 2012, 31(27): 3223-3234. DOI: 10.1038/onc.2011.483.
- [收稿日期] 2016-01-12 [修回日期] 2016-02-20
[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1)生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2)各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMRI*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3)限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam* HI、*Sal* I 等。(4)各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数 \bar{x} 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5)各种物理量的量符号应斜体(pH 用正体除外),例如长度 *l*(或 *L*)、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M_r*、物质的量浓度 *c_B* 等。(6)化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*- 等。(7)数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8)英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)