

[文章编号] 1000-4718(2019)02-0298-07

Twist 通过 ERK 通路对体外鼻咽癌细胞血管生成的影响*

孙旭鸯¹, 陈湧^{2△}¹浙江省丽水市中心医院耳鼻喉科, 浙江 丽水 323000; ²岳阳市第二人民医院胃肠外科, 湖南 岳阳 414000)

[摘要] 目的: 探讨 Twist 转录因子通过 ERK 通路对体外鼻咽癌 CNE2 细胞血管生成的影响。方法: 利用 Lipofectamine 2000 将 *Twist* 基因干扰序列转入体外培养的鼻咽癌 CNE2 细胞, 提取细胞条件培养基 (conditioned medium, CM), 用 CM 作用体外人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 后, CCK-8 检测细胞活力, Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力, 小管形成实验检验 HUVECs 体外血管生成能力, real-time PCR 检测 Twist mRNA 在 CNE2 细胞中的表达, Western blot 法检测 CNE2 细胞中 ERK、p-ERK、p38、p-p38、JNK、p-JNK 和 VEGF 的表达。另外, 使用 ERK、p38 和 JNK 通路抑制剂作用 CNE2 细胞后, 再检测通路抑制剂对体外 HUVECs 小管形成的影响。结果: CNE2 细胞转染 *Twist* 干扰序列后可显著抑制 Twist mRNA 及蛋白表达水平; 从沉默 *Twist* 基因的 CNE2 细胞提取的 CM 促进体外 HUVECs 活力、侵袭和小管形成的能力均明显被削弱; 抑制 CNE2 细胞中 Twist 的表达可上调 p-ERK 并下调 VEGF 的表达 ($P < 0.01$), 而对 p-p38 和 p-JNK 的表达无明显影响; ERK 通路抑制剂 PD98059 可部分削弱 *Twist* 干扰序列对体外 HUVECs 小管形成的抑制作用。结论: 沉默 *Twist* 基因可显著抑制体外鼻咽癌细胞的促血管生成作用, 该作用可能部分通过上调 ERK 信号通路实现。

[关键词] 鼻咽癌; Twist 转录因子; ERK 信号通路; 血管生成**[中图分类号]** R739.63; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.02.018

Effect of Twist on angiogenesis of nasopharyngeal cancer cells by regulating ERK signaling pathway

SUN Xu-yang¹, CHEN Yong²¹Department of Otolaryngology, Lishui Central Hospital, Lishui 323000, China; ²Department of Gastrointestinal Surgery, The Second People Hospital of Yueyang, Yueyang 414000, China. E-mail: 18182009800@126.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of Twist transcription factor on angiogenesis of nasopharyngeal cancer cells by regulating ERK signaling pathway *in vitro*. **METHODS:** *Twist* siRNA was transfected into the CNE2 cells with Lipofectamine 2000, and the CNE2 cell-conditioned medium (CM) was prepared, which was then used to treat human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). The CCK-8 assay, Boyden chamber and capillary tube formation assay were used to evaluate the angiogenic activity of HUVECs. The mRNA expression of Twist in nasopharyngeal cancer cells was detected by real-time PCR. The protein levels of Twist, ERK, p-ERK, p38, p-p38, JNK, p-JNK and VEGF were detected by Western blot. The ERK, p38 and JNK signaling pathway inhibitors were employed to treat HUVECs, and their effect on the capillary tube formation of HUVECs was analyzed. **RESULTS:** The expression of Twist at mRNA and protein levels in the CNE2 cells was significantly inhibited after transfection with *Twist* siRNA ($P < 0.01$). The abilities of proliferation, invasion and capillary tube formation of HUVECs were markedly suppressed after knockdown of *Twist* expression ($P < 0.01$). The protein level of p-ERK was significantly elevated in the CNE2-siTwist cells, while VEGF expression was decreased. Knockdown of *Twist* did no change the levels of p-p38 and p-JNK. The ERK signaling pathway inhibitor partly abrogated the anti-angiogenic effect of *Twist* knockdown. **CONCLUSION:** Knockdown of *Twist* inhibits the angiogenesis of nasopharyngeal cancer cells *in vitro* partly through activation of ERK signaling pathway.

[KEY WORDS] Nasopharyngeal carcinoma; Twist transcription factor; ERK signaling pathway; Angiogenesis

[收稿日期] 2018-03-27 [修回日期] 2018-05-16

* [基金项目] 湖南省卫计委科研计划项目 (No. B2017232)

△通讯作者 Tel: 0730-8246300; E-mail: 18182009800@126.com

鼻咽癌作为一种好发于鼻咽部咽隐窝和顶前壁黏膜上皮的恶性肿瘤,其病因和遗传易感性、EB病毒及环境污染等因素密切相关。早期鼻咽癌缺乏典型临床症状,同时鼻咽癌的血供极为丰富,早期就可能发生颈部淋巴结转移或远处转移,从而导致鼻咽癌患者的预后较差。目前尚未鉴定出与鼻咽癌特异性较高的癌基因和抑癌基因,导致鼻咽癌发病机制仍不明确^[1-2]。因此,寻找鼻咽癌特异性分子标志并从基因水平上抑制促癌基因的表达或者上调抑癌基因的表达,可能对鼻咽癌的发生发展起抑制作用。

Twist 转录因子作为主要由胎盘和中胚层组织分泌的细胞因子,在胎儿时期呈高表达,出生后在正常组织中表达含量极低,其不仅在胚胎发育成熟过程中扮演着重要角色,同时在诱导细胞迁移和组织塑性过程中发挥重要作用^[3-4]。在研究 Twist 与恶性肿瘤的关系中发现, Twist 在鼻咽癌、食管癌、骨肉瘤、前列腺癌和结肠癌等恶性肿瘤组织中的表达较正常组织均明显升高^[5-7];进一步分析 Twist 与恶性肿瘤生物学行为的关系中发现, Twist 可通过调控细胞黏附因子、促血管生成因子和金属基质蛋白酶等肿瘤相关因子的表达从而促进肿瘤细胞迁移、侵袭和脉管生成等过程,利于肿瘤发展和转移。通过聚类分析和芯片杂交等技术研究胚胎干细胞发育与血管分化的关系中发现, Twist 可能参与了血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*)、*ANG1*、*PDGF* 等基因的调控,从而在血管生成(angiogenesis)过程中发挥了重要调控作用^[8]。既往研究已经表明 Twist 参与多种恶性肿瘤的恶性生物学行为,目前尚未有 Twist 与鼻咽癌细胞血管生成的研究见诸报道,为此,本研究通过 RNA 干扰技术特异性沉默 *Twist* 在鼻咽癌细胞中的表达,探讨 Twist 对体外鼻咽癌细胞血管生成的影响及其可能作用机制,为鼻咽癌血管靶向治疗提供新的临床参考。

材 料 和 方 法

1 试剂和材料

DMEM 高糖培养基、无血清 Opti-MEM1 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶-EDTA 消化液均购自 Gibco;空载体 pEGFP 和 *Twist* 沉默载体 pEGFP-siTwist 购自北京合生基因科技有限公司; Lipofectamine 2000 和 TRIzol 试剂购自 Thermo; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于中杉金桥生物技术有限公司; cDNA 第一链合成试剂盒和 RT Master Mix 荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa; Twist 和 GAPDH 的上、下游引物由上海英潍捷基公司合成; CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物

技术有限公司; Transwell 小室购自 Corning; Matrigel 基质胶购自 BD; 抗 Twist 和 β -actin 抗体购自 Abcam; 抗 p-JNK、JNK、ERK、p-ERK、p38、p-p38 和 VEGF 抗体购自 Epitomics; JNK 通路抑制剂 SP600125、ERK 通路抑制剂 PD98059 和 p38 通路抑制剂 SB203580 购自 Sigma。

2 细胞培养

人鼻咽癌细胞株 CNE2 和人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,细胞均使用含 20% 灭活胎牛血清的 DMEM 高糖培养基进行培养和传代。细胞置于细胞培养箱中进行孵育,细胞培养箱调整温度为 37 °C,二氧化碳浓度为 5%,将细胞悬液接种于 60 mL 斜颈细胞培养瓶中,内盛 10 mL 完全培养基,内皮细胞生长方式为单层贴壁生长,细胞在细胞培养箱内生 3 d 后即可可生长至 80% ~ 90% 瓶底面积,然后使用含 EDTA 胰酶进行消化,取对数生长期细胞用于实验操作。

3 实验方法

3.1 细胞转染 收集对数生长期的 CNE2 细胞,用完全培养基制成单细胞悬液,调整浓度为 $5 \times 10^9/L$,将细胞悬液接种至 6 孔板中,每孔 100 μ L,每组设 3 个复孔,将细胞分为 *Twist* siRNA + Lipofectamine 2000 组(siTwist 组)、阴性对照(negative control, NC) + Lipofectamine 2000 组(NC 组)和空白对照(blank control, BC)组,按照转染试剂 Lipofectamine 2000 说明书进行操作。

3.2 Western blot 法检测蛋白表达 CNE2 细胞提取蛋白后经按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书提取总蛋白,每份样品使用 20 μ g 蛋白质,使用 10% SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜上,在 4 °C 下使用 5% 脱脂奶粉封闭过夜,硝酸纤维素膜经 I 抗和 II 抗反应后滴加新鲜配置的 ECL 化学发光液显色、曝光和显影。

3.3 Real-time PCR 检测 Twist mRNA 的表达

CNE2 细胞经 TRIzol 作用后提取细胞总 RNA,利用紫外分光光度仪检测稀释好的 RNA 标本的吸光度(A)值,设定波长为 260 nm 和 280 nm,计算 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8 ~ 2.1 之间。按照逆转录反应试剂盒说明书实施逆转录合成 cDNA,按 real-time PCR 说明书配制反应体系,反应条件为: 50 °C 2 min; 95 °C 2 min; 95 °C 20 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s, 80 °C 15 s, 读板后重复 44 个循环。以 GAPDH 为内参照。Twist 上游引物为 5'-GGAGTCCGCGACTCTTACGAG-3', 下游引物为 5'-TCTGGAGGACCTGGTAGAGG-3'; GAP-

DH 上游引物为 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 下游引物为 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'。依照标准曲线中绘制的各个样本的拷贝数,以测定的 *Twist* 表达量与 *GAPDH* 表达量的比值作为基准来校准表达量,实验重复 3 次,取平均值。

3.4 收集鼻咽癌细胞条件培养基 (conditioned medium, CM) 将 CNE2 细胞接种于 75 cm² 培养瓶中,加入适量完全培养基,待细胞生长至 80% 底面积时用移液器吸去原培养基,用 PBS 缓冲液反复冲洗 4 次,再加入不含血清的 DMEM 培养基 20 mL,放置细胞培养箱孵育 12 h 后收集上清液,以 2 500 rpm 速度下常温离心 5 min,将上清液用 0.22 μm 过滤器过滤后,保存于 4 °C 冰箱中。

3.5 HUVECs 与 CM 共培养 将 HUVECs 接种于 6 孔培养瓶中,加入含 20% FBS 的 DMEM 培养基,待细胞生长至 80% 底面积时用移液器吸去原培养基,用 PBS 缓冲液反复冲洗 2 次,加入 CM 培养 24 h。

3.6 CCK-8 法检测细胞活力 将 HUVECs 接种于 25 cm² 培养瓶中,加入适量完全培养基,待细胞生长至 80% 底面积时用胰酶消化并收集对数生长期细胞,用含 20% FBS 的 DMEM 培养基制成单细胞悬液,并调整浓度为 5 × 10⁷/L,将细胞悬液接种至 96 孔板中,每孔 100 μL,每组设 5 个复孔,将 96 孔板置于细胞培养箱中培养 72 h,在结束前 1 h 将 10 μL 的 CCK-8 溶液加入 96 孔板中,放入细胞培养箱继续培养 1 h 后立即用酶标仪检测各孔 A 值,设定波长为 490 nm,同时设空白调零组(不加细胞仅加等量培养基)。

3.7 Transwell 小室侵袭实验 将 Matrigel 均匀铺被到 Transwell 上室底部,待 Matrigel 完全凝固后,小心取出上室中残余液体,再加入 50 μL 无血清 DMEM 培养基。调整 HUVECs 浓度 1 × 10⁸/L,将 200 μL 细胞悬液加入 Transwell 上室中,同时在 Transwell 下室中添加 500 μL 含 20% 胎牛血清的细胞培养基,然后将 Transwell 小室放置于细胞培养箱中继续孵育 24 h,实验重复 3 次,每组设 5 个复孔。将放置培养箱中孵育 24 h 的 Transwell 小室取出,去除上室及下室中的培养基,用棉棒小心擦去小室底膜上的细胞,将 Transwell 上室放置在 10% 甲醇溶液中固定 20 min,用 PBS 液清洗 3 遍后再用结晶紫溶液染色 15 min。将 Transwell 上室自结晶紫溶液中取出后,使用 PBS 溶液清洗 3 遍,将 Transwell 上室置于载物片上,放置于倒置显微镜下观察并拍照,在高倍镜下随机选择 10 个视野拍照并采集图像。

3.8 小管形成实验 将不含胎牛血清的培养基和

Matrigel 放置 4 °C 冰箱过夜预冷,待其变成胶冻状,以 1:2 的比例混合培养基和 Matrigel,将 250 μL 稀释后的 Matrigel 加入 24 孔板中,再放入细胞培养箱中孵育 1 h,至 Matrigel 凝固。调整 HUVECs 浓度为 2 × 10⁵/L,将 0.1 mL 细胞悬液接种于预先铺好基质胶的 24 孔板中,再放置细胞培养箱中孵育过夜,最后在倒置显微镜下观察小管形成状况,利用 ImageJ 1.51f 软件对管腔样结构的数量进行定量分析^[9]。

3.9 JNK、ERK 和 p38 信号通路抑制剂对 HUVECs 小管形成的影响 实验设置 NC 组、si*Twist* 组、si*Twist* + SP600125 组、si*Twist* + PD98059 组和 si*Twist* + SB203580 组,NC 组和 si*Twist* 组 CNE2 细胞添加 PBS 作用 2 h,后 3 组分别用 10 μmol/L 的 JNK 通路抑制剂 SP600125、ERK 通路抑制剂 PD98059 和 p38 通路抑制剂 SB203580 作用 CNE2 细胞 2 h,提取各组细胞 CM,按照 3.8 方法检测 HUVECs 小管形成,实验重复 3 次,取平均值。

4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计分析软件进行统计学分析,所有本次实验所得的计量数据均以均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示,率的比较用卡方检验,采用 SNK-q 法分析总体及总体中两样本均数之间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 Real-time PCR 和 Western blot 检测 *Twist* siRNA 的干扰效率

将空载体和 *Twist* 沉默载体转染鼻咽癌 CNE2 细胞 48 h 后,提取各组 CNE2 细胞总 RNA 进行 real-time PCR 以检测 *Twist* mRNA 的相对表达量,NC 组和 BC 组 CNE2 细胞中 *Twist* mRNA 相对表达量为 0.84 ± 0.07 和 0.87 ± 0.08,与 si*Twist* 组 (0.17 ± 0.02) 相比较显著升高 ($P < 0.01$),而 NC 组和 BC 组之间相比较无统计学差异。Western blot 检测 *Twist* 蛋白在 si*Twist* 组 CNE2 细胞中的相对表达量为 2.32 ± 0.16,与仅转染空载体的 CNE2 细胞 (6.51 ± 0.52) 和 BC 组细胞 (6.94 ± 0.65) 相比较显著降低 ($P < 0.01$),NC 组和 BC 组之间相比较无统计学差异,见图 1。

2 沉默 *Twist* 基因对 HUVECs 体外活力的影响

为评估干扰 *Twist* 在鼻咽癌细胞中的表达后对体外 HUVECs 活力的影响,分别提取 NC 组、BC 组和 si*Twist* 组 CNE2 细胞 CM,通过 CCK-8 法对 HUVECs 活力进行检测,结果表明,HUVECs 经 si*Twist* 组 CNE2

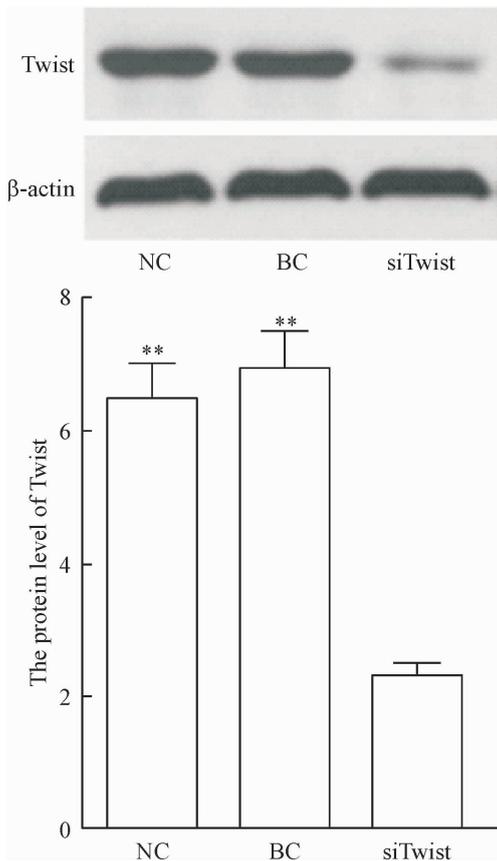


Figure 1. Knockdown of *Twist* was analyzed by Western blot assay. Mean \pm SD. $n=3$. $**P<0.01$ vs siTwist group.

图1 Western blot 检测 *Twist* 蛋白在 CNE2 细胞中的表达水平

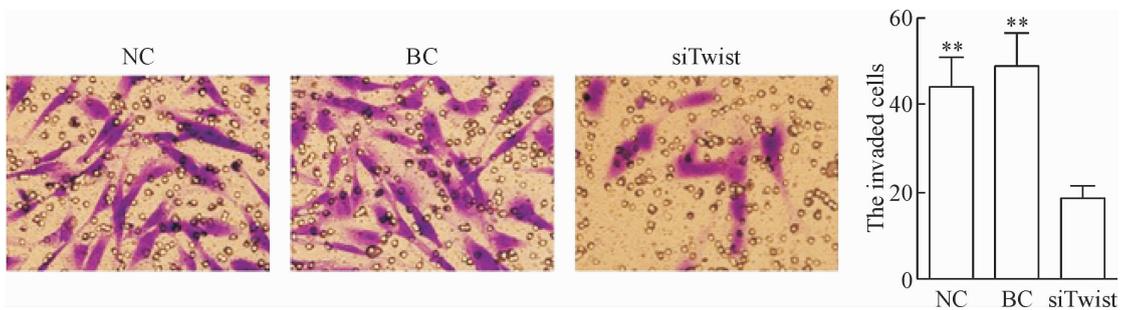


Figure 2. The effect of *Twist* silencing on the invasive ability of HUVECs *in vitro* ($\times 200$). Mean \pm SD. $n=3$. $**P<0.01$ vs siTwist group.

图2 Transwell 小室实验检测沉默 *Twist* 对 HUVECs 侵袭能力的影响

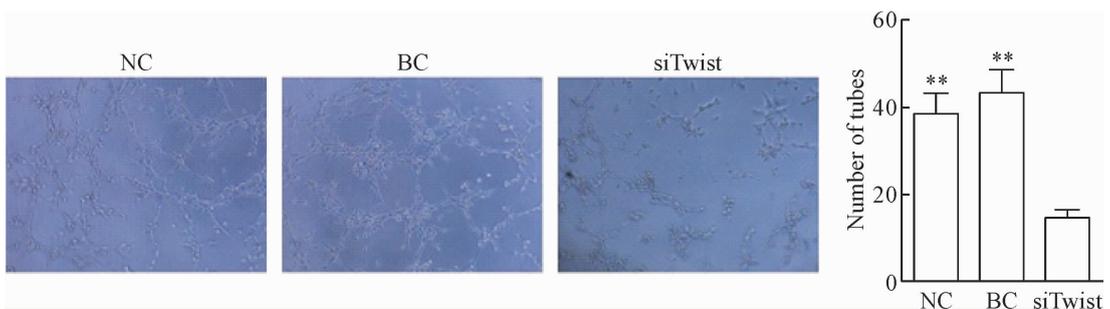


Figure 3. The effect of *Twist* silencing on the tube formation of HUVECs *in vitro* ($\times 200$). Mean \pm SD. $n=3$. $**P<0.01$ vs siTwist group.

图3 小管形成实验观察沉默 *Twist* 对 HUVECs 小管形成的影响

细胞所提取的 CM 作用 24 h 后, A 值为 0.53 ± 0.13 , 而 HUVECs 经 NC 组和 BC 组 CNE2 细胞所提取的 CM 作用 24 h 后 A 值分别为 1.49 ± 0.35 和 1.37 ± 0.24 , siTwist 组与 NC 组和 BC 组相比较显著降低 ($P<0.01$), 表明沉默 *Twist* 在鼻咽癌细胞中的表达可显著抑制 HUVECs 活力。

3 干扰 *Twist* 基因的鼻咽癌细胞 CM 对体外 HUVECs 侵袭能力的影响

在体外 CNE2 细胞中分别转染 siTwist 和空载体后, 提取各组细胞 CM, HUVECs 经 CM 作用 24 h 后进行 Transwell 小室侵袭实验。细胞侵袭实验结果表明, HUVECs 经 siTwist 组 CNE2 细胞所提取的 CM 作用 24 h 后侵袭出 Matrigel 的细胞数较 NC 组和 BC 组显著降低 ($P<0.01$), 见图 2。

4 干扰 *Twist* 基因的鼻咽癌细胞 CM 对体外 HUVECs 小管形成的影响

利用小管形成实验检验干扰 *Twist* 基因的鼻咽癌细胞 CM 对体外 HUVECs 的体外血管生成能力, 结果显示, HUVECs 在体外 Matrigel 基质环境中生长 12 h 后, 细胞逐渐向两端延长呈梭形, 同时细胞延长端开始在 Matrigel 胶中伸展, 相邻细胞开始出现联接并出现管腔样结构。HUVECs 经 siTwist 组 CNE2 细胞所提取的 CM 作用 24 h 后体外小管形成数较 NC 组和 BC 组显著降低 ($P<0.01$), 见图 3。

5 Twist 对 CNE2 细胞中 p-ERK、p-p38、p-JNK 和 VEGF 表达的影响

分别转染空载体和 siTwist 至 CNE2 细胞后,通过 Western blot 检测 p-ERK、p-p38、p-JNK 和 VEGF 在鼻咽癌 CNE2 细胞中的表达,结果显示,siTwist 组

CNE2 细胞的 ERK 磷酸化水平明显高于 NC 组和 BC 组,而 VEGF 蛋白水平明显低于 NC 组和 BC 组($P < 0.01$);下调 *Twist* 在 CNE2 细胞中的表达对 p-p38 和 p-JNK 的表达无明显影响,见图 4。

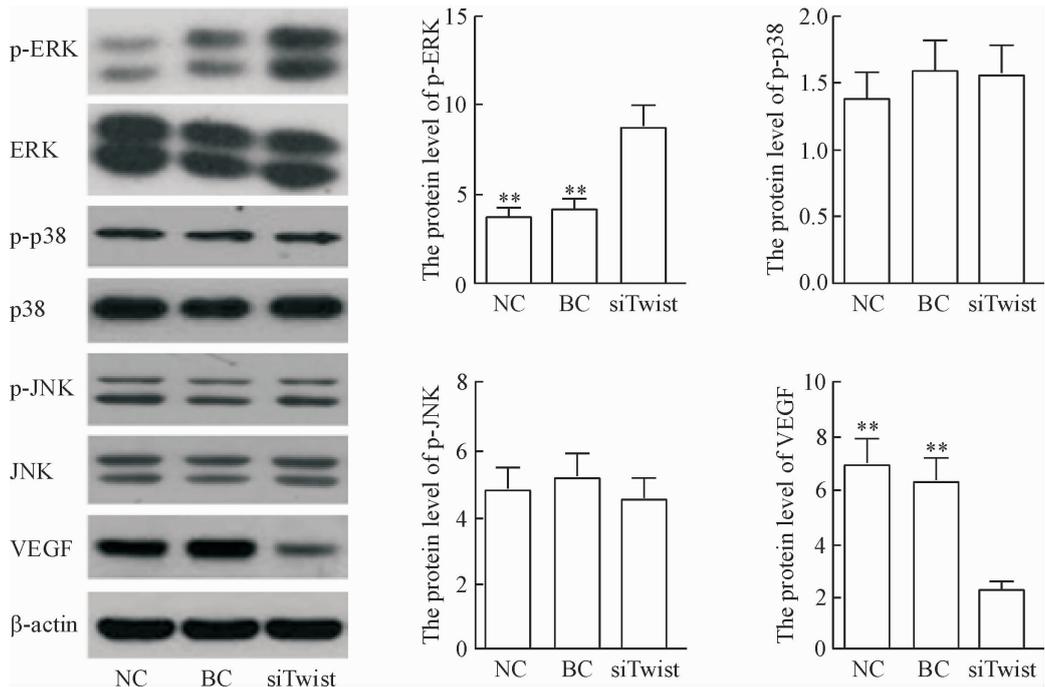


Figure 4. The protein levels of p-ERK, p-p38, p-JNK and VEGF were assessed by Western blot analysis in the CNE2 cells after transfected with negative control (NC), blank control (BC) and siTwist. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs siTwist group.

图 4 Western blot 检测转染 siTwist 对 CNE2 细胞中 p-ERK、p-p38、p-JNK 和 VEGF 表达的影响

6 ERK、JNK 和 p38 信号通路抑制剂对 HUVECs 体外小管形成的影响

NC 组、siTwist 组、siTwist + PD98059 组、siTwist + SP600125 组和 siTwist + SB203580 组 CNE2 细胞所提取 CM 作用 HUVECs 后, HUVECs 体外小管形成数分别为 48.3 ± 4.2 、 22.7 ± 3.6 、 39.1 ± 4.7 、 25.6 ± 3.3 和 27.5 ± 2.8 。与 NC 组相比, siTwist 组 HUVECs 体外小管形成数显著减少($P < 0.01$);与 siTwist 组相比, siTwist + PD98059 组显著升高($P < 0.05$);而 siTwist 组与 siTwist + SP600125 组或 siTwist + SB203580 组相比较,差异无统计学意义,见图 5。

讨 论

Twist 作为定位于人类 7 号染色体的基因,编码由 202 个氨基酸组成的 Twist 蛋白。Twist 蛋白属于碱性螺旋-环-螺旋结构家族成员,首先在果蝇中被发现,这种蛋白在果蝇中胚层的发育和诱导细胞迁移运动中发挥了重要作用。进一步研究发现 *Twist* 在多种实体瘤中表达上调, *Twist* 可通过诱导上皮细胞向间质细胞发生转换,从而在细胞凋亡、转移和血管

新生中起到重要调控作用。目前关于 *Twist* 在实体瘤中的表达以及与肿瘤转移的相关研究已有较多见诸报道,但 *Twist* 与肿瘤血管新生的相关性研究较少,尤其是在鼻咽癌中^[6-8]。

血管内皮细胞作为血管内侧的一层扁平上皮细胞,在机体各脏器中分布广泛,血管内皮细胞作为组织和血液间的第一道屏障,在细胞炎症信号、切应力和激素水平等信号的作用下,可分泌多种血管活性物质,从而调节血液稳态、新生血管形成和组织再生等作用。血管内皮细胞已成为在机体多种病理生理过程中起关键调控作用的重要器官。肿瘤组织中的血管内皮细胞在组织形态、增生方式和免疫学特征等方面和正常组织血管内皮细胞存在较大差异,肿瘤组织内血管内皮细胞增生为顺应肿瘤生长的需要,在肿瘤细胞分泌的多种促血管生长因子的作用下,肿瘤血管内皮细胞的活力、侵袭能力以及新生血管能力均得到不同程度增强,以适应肿瘤发展和转移的需要。为此,根据肿瘤内皮细胞的特点,靶向肿瘤血管内皮细胞治疗应运而生,有效抑制包括鼻咽癌在内的肿瘤新生血管形成,可有效抑制恶性肿瘤

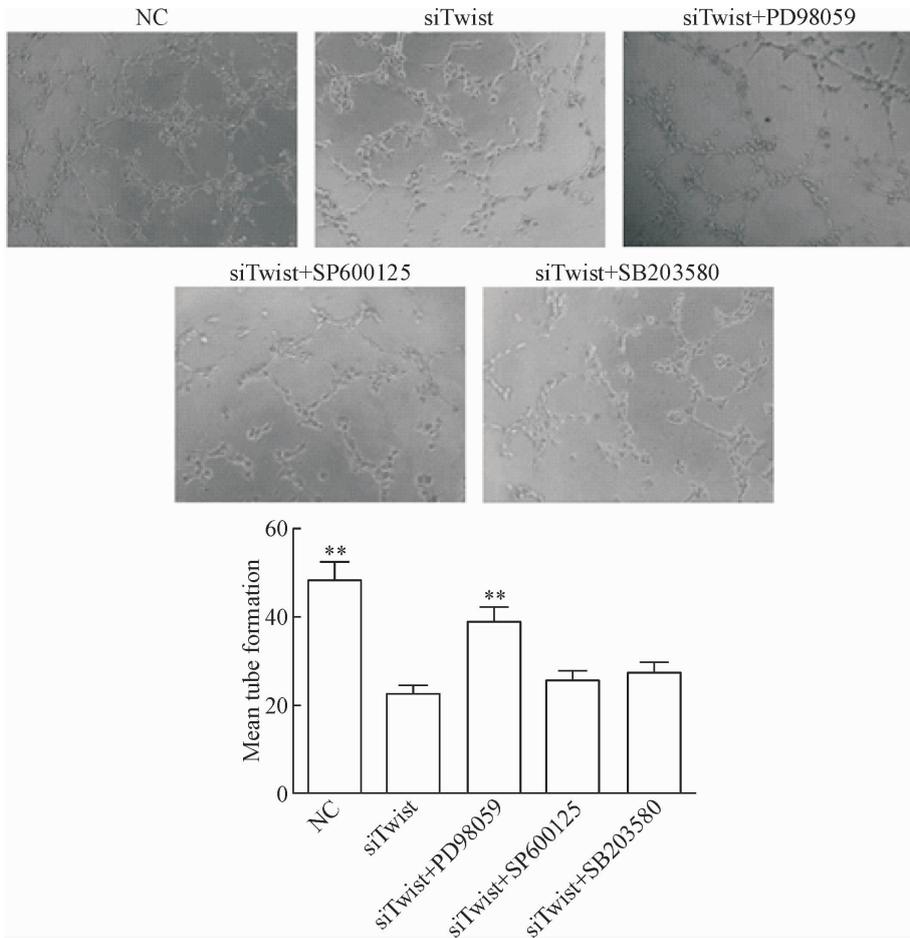


Figure 5. Analysis of the tube formation of HUVECs treated with CM from CNE2 cells in siTwist, siTwist + PD98059, siTwist + SP600125 and siTwist + SB203580 groups (×200). Mean ± SD. n = 3. **P < 0. 01 vs siTwist group.

图 5 小管形成实验观察 ERK、p38 和 JNK 信号通路抑制剂对 HUVECs 体外小管形成的影响

的发展和转移,从而改善恶性肿瘤患者预后^[10-11]。在本研究中,将 *Twist* 沉默载体转染至体外 CNE2 细胞,并通过 RT-PCR 和 Western blot 检测证实 *Twist* 沉默载体可显著下调 *Twist* mRNA 和蛋白在鼻咽癌细胞中的表达,并获取干扰 *Twist* 基因后鼻咽癌细胞特定培养基,并用该特定培养基作用体外 HUVECs,对血管内皮细胞活力、侵袭能力和血管新生能力进行了进一步研究。首先,我们利用 CCK-8 实验分析干扰 *Twist* 在鼻咽癌细胞中的表达后对体外 HUVECs 活力的影响,结果表明,沉默 CNE2 细胞中 *Twist* 的表达后可有效抑制体外 HUVECs 活力,从而表明 *Twist* 在 HUVECs 体外生长中发挥了一定作用。Transwell 小室实验结果表明,沉默 *Twist* 的表达后可有效抑制体外 HUVECs 侵袭行为。另外通过小管形成实验模拟 HUVECs 体外血管形成,在体外 Matrigel 基质环境中生长 12 h 后,细胞逐渐向两端延长呈梭形,同时细胞延长端开始在 Matrigel 中伸展,相邻细胞开始出现联接并出现管腔样结构,低表达 *Twist* 基因的 CNE2 细胞上清液可明显抑制体外 HUVECs 体外小管形

成,从而表明 *Twist* 在鼻咽癌细胞中的表达水平在体外鼻咽癌细胞促进血管新生行为中也发挥了一定作用,提示 *Twist* 可能在鼻咽癌体外血管新生的发展过程中发挥促进功能,应该被视为鼻咽癌潜在的一个新的靶向作用位点。

ERK 作为一种脯氨酸导向的丝氨酸/苏氨酸激酶,主要位于细胞浆中,在诸如生长因子、激素、细胞因子、高糖和缺氧等刺激后作用下被激活,激活后 ERK 可进入细胞核中,进一步激活 NF-κB 及 P70 核蛋白体 S6 激酶,使得相邻脯氨酸的丝氨酸/苏氨酸发生磷酸化。磷酸化 ERK 在介导信号从细胞膜表面受体传导至细胞核过程中发挥关键调控作用,p-ERK 可激活 STATs、c-Myc、Jun、ELK-1、ATF2 和 Max 等转录因子,进而对这些转录因子各自靶基因的转录和翻译过程产生影响,最终对内皮细胞的迁移、分化和增殖等多种生理学功能发挥调控作用^[12-14]。SP600125 作为 ERK 信号转导的特异性抑制剂,可通过阻断 Raf 对 ERK 的磷酸化从而进一步阻断下游信号通路。血管内皮细胞生长因子作为一种在可由正

常细胞和肿瘤细胞合成分泌的细胞因子,VEGF 在正常组织细胞中呈低水平表达,且表达水平较为恒定,但在许多肿瘤细胞中表达上调,是促进肿瘤细胞新生的最重要调节因子。有研究表明,VEGF 在恶性肿瘤细胞中的异常表达与肿瘤肝转移存在正相关性,同时与恶性肿瘤患者的预后呈明显负相关。VEGF 在肿瘤细胞中的表达与 ERK 磷酸化水平关系密切,重组人肝细胞生长因子可通过 ERK 信号通路上调肿瘤细胞中 VEGF 的表达,从而促进肿瘤组织中血管生长^[15]。在本研究中,下调 Twist 在鼻咽癌细胞中的表达可促进 CNE2 细胞中 ERK 的磷酸化水平,同时下调 VEGF 的表达,但对 JNK 和 p38 的表达无明显影响,而进一步使用 ERK 信号通路特异性抑制剂作用后发现,SP600125 可部分阻断沉默 *Twist* 对体外 HUVECs 小管形成的抑制作用,使用 JNK 和 p38 通路抑制剂却没有观察到这种抑制作用,从而表明 Twist 可能调控鼻咽癌细胞中 ERK 信号通路,影响 VEGF 的表达从而在体外血管新生过程中发挥了一定作用。

综上所述, Twist 可通过抑制 ERK 信号通路的激活而调控鼻咽癌细胞对体外内皮细胞活力、侵袭和小管形成的作用,表明 Twist 可能在鼻咽癌血管新生中扮演了重要角色。 Twist 有望成为治疗鼻咽癌新的作用靶点,后续会在体内进行进一步的验证及探讨。

[参 考 文 献]

[1] Yang L, Xu Z, Liu L, et al. Targeting EBV-LMP1 DNAzyme enhances radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting telomerase activity[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(1): 61-68.

[2] Luo W, Yao K. Molecular characterization and clinical implications of spindle cells in nasopharyngeal carcinoma: a novel molecule-morphology model of tumor progression proposed[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e83135.

[3] Titze-de-Almeida R, David C, Titze-de-Almeida SS. The race of 10 synthetic RNAi-based drugs to the pharmaceutical market[J]. *Pharm Res*, 2017, 34(7):1339-1363.

[4] Malamas AS, Hammond SA, Schlom J, et al. Combination therapy with an OX40L fusion protein and a vaccine targeting the transcription factor twist inhibits metastasis in

a murine model of breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(53):90825-90841.

[5] Gao H, Yang M, Yang H, et al. Arabidopsis ENOR3 regulates RNAi-mediated antiviral defense [J]. *J Genet Genomics*, 2018, 45(1):33-40.

[6] Xu Z, Zheng G, Wang Y, et al. Aqueous huaier extract suppresses gastric cancer metastasis and epithelial to mesenchymal transition by targeting twist[J]. *J Cancer*, 2017, 8(18):3876-3886.

[7] Wu ST, Williams CD, Grover PA, et al. Early detection of pancreatic cancer in mouse models using a novel antibody, TAB004[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2):e0193260.

[8] Xie F, Huang Q, Liu CH, et al. MiR-1271 negatively regulates AKT/MTOR signaling and promotes apoptosis via targeting PDK1 in pancreatic cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(3):678-686.

[9] Yan JJ, Zhang YN, Liao JZ, et al. MiR-497 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting VEGFA and AEG-1 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30):29527-29542.

[10] Ko D, Kim S. Cooperation between ZEB2 and Sp1 promotes cancer cell survival and angiogenesis during metastasis through induction of survivin and VEGF[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1):726-742.

[11] Wang Y, Li C, Li Y, et al. Involvement of breast cancer stem cells in tumor angiogenesis[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6):8150-8155.

[12] 王伟,王坤.雷公藤甲素通过 ERK 通路诱导肺癌 A549 细胞自噬[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(9):1551-1555.

[13] 蒋智,贾中申,吴玥婷,等. EdCC 通过 MEK-ERK 信号通路减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(2):221-227.

[14] 杨淑娟,何英利,马晓华,等. 碧萝芷通过下调 ERK 磷酸化及自噬水平抑制 TGF-β1 诱导的肝星状细胞活化[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(12):2261-2265.

[15] Huang F, Yao Y, Wu J, et al. Curcumin inhibits gastric cancer-derived mesenchymal stem cells mediated angiogenesis by regulating NF-κB/VEGF signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12):5538-5547.

(责任编辑:卢萍,罗森)