TWIST 表达与恶性肿瘤转移关系的研究进展

方雪妮,周 天,李泉旺,胡凯文
(北京中医药大学东方医院,北京 100078)

摘要: Twist 是高度保守的碱性螺旋-环-螺旋转录因子,为新近发现的癌基因。Twist 能够编码凋亡抑制蛋白,参与多种上皮来源肿瘤细胞的上皮间充质转化(EMT)过程,调控肿瘤血管、淋巴管的生成等过程,与肿瘤的侵袭、转移关系密切。目前已在多种肿瘤中发现 Twist 表达增高,开展 Twist 表达与肿瘤的侵袭转移关联性的研究对临床预防、治疗癌症转移意义重大。

关键词: Twist;肿瘤转移;EMT;血管形成;淋巴管形成

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)11-0893-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.11.A012

Relationship between TWIST and Metastasis of Malignant Tumor

FANG Xue-ni, ZHOU Tian, LI Quan-wang, et al.

(Dongfang Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078)

Abstract: Twist is a highly conserved basic helix-loop-helix transcription factor, which is considered as an oncogene recently. Twist gene is involved in encoding inhibition of apoptosis protein and promoting epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer, and may participate in tumor invasion and metastasis, angiogenesis and lymphangiogenesis. Study on the association of Twist with tumor invasion and metastasis would be of value in clinical prevention and treatment of cancer metastasis.

Key words: Twist; tumor metastasis; EMT; angiogenesis; lymphangiogenesis

恶性肿瘤是细胞无限制增生的结果,人体内存在癌基因和抑癌基因两大功能相异的基因群。肿瘤的发生是原癌基因激活和抑癌基因失活的共同作用。Twist 为新近发现的癌基因,在多种恶性肿瘤中高表达。研究显示 Twist 与上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、肿瘤血管、淋巴管形成等过程密切相关, Twist 蛋白在肿瘤的侵袭和转移过程中起重要作用。

1 Twist 简介

1.1 Twist 结构

Twist 基因最早发现于果蝇身上,因其突变后引

起果蝇胚胎扭曲样变化而得名,随后研究者在非洲蟾蜍、文昌鱼、斑马鱼、小鼠、大鼠以及人类中发现也存在 Twist 基因^[1,2], Twist 基因的核苷酸和氨基酸序列在不同种属中高度保守: DNA 序列 100% 保守,能结合一种 E-box 的 DNA 序列;氨基酸序列有 96% 保守。哺乳动物中存在两种 Twist 基因,分别为 Twist-1 (Twist) 和 Twist-2 (dermo-1)^[3]。Twist-1 和 Twist-2 的 bHLH 和羧基端的功能域有超过 90% 是一致的。Twist-1 的氨基端富含甘氨酸,而 Twist-2 的氨基端缺少甘氨酸。

人 Twist 基因位于 7p21.2, 含有 1 个内含子和 2 个外显子,内含子长为 538bp,第 1 个外显子长为 772bp,包含整个编码区域。其 mRNA 全长 1 669bp,有一含 609 个碱基的连续开放性读码框(+315 至+922)^[4]。Twist 基因 5'端调节区域的启动子序列

收稿日期:2015-03-12;修回日期:2016-05-08

基金项目:国家自然科学基金(81403250)

通讯作者:周天, E-mail: zhoutian_med@163.com

上游有 NF- κ B、enrailed、AP-2、SP-1、RB 和 ATF/CREB 等蛋白分子的结合位点。

Twist 基因所编码的 Twist 蛋白为碱性螺旋-环-螺(bHLH)转录因子,功能和其他 bHLH 转录因子类似。HLH 转录因子是调节细胞生长和分化的重要因子,参与调控器官生长发育、细胞增殖分化、肿瘤发生等过程^[5,6]。大多数 HLH 蛋白都属于 bHLH 家族成员,bHLH 的高表达能够促进干细胞的分化,在哺乳动物的神经和骨骼肌的发育中发挥了重要作用。人 Twist 蛋白由 202 个氨基酸组成,分子量为 26kD,等电点为 9.591,由 N-端、bHLH、C-端三个区域组成,其 C-末端呈疏水性且含有碱性的 DNA 结合序列和二聚化作用基序,N-末端为亲水性,bHLH 与 DNA 上的 E-box 结合后,可形成同源或异源二聚体,调节靶基因的表达^[7]。

1.2 Twist 功能

Twist 主要表达于胎盘、胚胎中胚层和某些中胚层来源的未分化组织,参与肌细胞、软骨细胞、骨原细胞等多种细胞系的分化,在诱导细胞迁移及组织塑型中起主要作用^[8],还能介导上皮细胞——间叶细胞的转化 (EMT)^[9],EMT 过程是恶性肿瘤细胞转移的关键分子事件。研究发现在鼠类中 Twist 对头间质、体节以及四肢的固有发生是必需的,鼠若缺失 Twist 基因则在胚胎第 11d 死亡^[10,11]。鼠胚胎纤维母细胞的体外实验表明, Twist 干扰 ARF-P53 调控通路,阻止 c-cyc 诱导的凋亡。人 Twist 基因突变还可导致人类一些遗传性疾病,如以颅缝早闭和肢体颜面异常为主要表现的 SC(Saethre-Chozen)综合征^[12]。

2 Twist 与恶性肿瘤转移

Twist 是与肿瘤发生、发展密切相关的核转录因子,能诱导肿瘤细胞 EMT 过程,与恶性肿瘤生长、侵袭、转移关系密切^[13-16]。目前多种实体恶性肿瘤研究已证实^[17], Twist 异常高表达是癌细胞侵袭转移的重要原因之一,如肺癌、乳腺癌^[18]、卵巢癌、前列腺癌、人神经胶质瘤和肝细胞癌等^[19]。另有研究发现 Twist 参与调控肿瘤细胞获得干细胞特性,增加肿瘤细胞迁移能力^[20]。

2.1 Twist 与 EMT 过程及肿瘤的侵袭转移

肿瘤的转移是一个复杂的多步骤过程^[21-23],包括侵袭 (invasion)、内渗 (intravasation)、外渗 (ex-

travasation)三个步骤:侵袭使肿瘤上皮细胞重新获得运动能力;肿瘤细胞通过血管或淋巴管的内皮内渗到循环系统;肿瘤细胞通过末梢的毛细血管内皮外渗到达靶器官形成继发肿瘤,完成转移。

EMT 是上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间充质细胞转分化的现象,这一概念是 Greenberg 和 Hay 在 1982 年提出的^[24]。通过 EMT,上皮细胞与周围细胞和基质的接触减少,细胞的迁移和运动能力增强^[25,26],肿瘤细胞可获得较高的抗凋亡、降解细胞外基质和侵袭与迁移能力等间质表型。近年多项研究均表明 EMT 是上皮性肿瘤细胞获得侵袭性的关键分子事件,在恶性肿瘤的发展及转移播散过程中发挥主要的病理作用^[27]。EMT 可视为肿瘤细胞浸润转移的开始^[28];中断或逆转 EMT,可以抑制恶性肿瘤细胞的侵袭,降低肿瘤的转移率。

EMT 现象特征是失去上皮性的标记 (如 E-cadherin),细胞角蛋白为主的细胞骨架转化为波形蛋白 (vimentin)为主的细胞骨架,获得间质细胞的标记 (如 vimentin、smoothmuscle actin、N-cadherin 等)。Twist、Snail、sip1 和 slu 等多种转录因子能够诱导 EMT,它们的共同特征是含有能识别靶基因启动子上的 E-box 基序的 DNA 结合序列。

Yang 等^[25]对小鼠乳腺癌细胞株体外和体内的系列实验研究表明, Twist 在肿瘤的转移阶段表达明显增强,而对肿瘤细胞的存活、生长速率等方面的作用不大。应用 RNA 干扰技术去除肿瘤高转移细胞株 Twist 基因的表达后,乳腺癌细胞肺转移的数目和速率都显著下降。

惠林萍^[29]研究发现, Twist 与肺癌的分化有关,肺鳞癌和肺腺癌组织中 Twist 较高表达,在癌旁肺组织中 Twist 弱表达,低分化的肺癌 Twist 高表达,中高分化的肺癌低阳性表达。Twist 表达上调可能引起肺泡上皮和支气管黏膜上皮向肿瘤转化。张洪兰等^[30]报道非小细胞肺癌组织 Twist 表达与肺癌临床分期、淋巴结转移和 EMT 与肿瘤转移密切相关^[31]。孙菊杰等^[32]报道,非小细胞肺癌组织 E-cadherin 表达较癌旁组织降低, Vimentin 表达较癌旁组织增加,提示 EMT 参与非小细胞肺癌发生发展和转移;同时非小细胞肺癌组织 Twist 蛋白表达与 E-cadherin 呈负相关,与 Vimentin 表达呈正相关,提示 Twist 表达与肺癌 EMT 有关。Nakashima 等^[33]在肺癌细胞系的研究显示,高表达 Twist 的肺癌细胞 Vi-

mentin 和 E-cadherin 的比值也高; Twist 异位高表达的肺癌细胞通过 EMT 显示明显的表型改变, 且迁移能力增加。有研究发现^[34], 人肺腺癌 NCI-H129 细胞过表达 *Twist* 基因后发生 EMT 形态学改变: 上皮形态变成梭形、纺锤形, 细胞间隙略变大, 细胞和细胞之间的连接变得松散, 排列紊乱。过表达 *Twist* 基因能够诱导人肺腺癌 NCI-H129 细胞发生 EMT, E-cadherin 表达下降, 而与间质细胞相关的基因和蛋白表达增强。 *Twist* 基因使人肺腺癌 NCI-H129 细胞的侵袭能力和迁移能力增强, 而增殖能力减弱。

在多种肿瘤研究^[18]中发现, *Twist* 是肿瘤细胞发生 EMT 的主要诱导因子之一, 能够直接诱导 EMT, 或间接地影响其他 EMT 的转录调控因子, 从而促进肿瘤细胞侵袭转移。首先, *Twist* 能直接抑制 E-cadherin 表达, 并上调纤连蛋白和 N 钙黏蛋白(N-cadherin)。Fu 等^[35]研究指出: *Twist* 以 *Twist*/Mi2/NuRD 蛋白复合物的形式发挥作用, *Twist*/Mi2/NuRD 与 E-cadherin 的启动子区域结合, 抑制 E-cadherin 的表达, 减弱细胞间连接, 促进细胞侵袭及转移, 从而诱导 EMT 的发生。其次, *Twist* 能够诱导 Snail1 和 Snail2 的表达, 间接影响 EMT 的发生^[36,37]。研究^[19]发现上调基因 *Hhip* 可以通过抑制 Hedgehog 途径介导的 EMT 来抑制乳腺癌转移; 下调的骨形态发生蛋白 2 能够促进 EMT 过程^[38], *Twist* 也有可能通过影响这两个基因的表达来促进 EMT 过程和肿瘤转移。

2.2 *Twist* 与肿瘤血管、淋巴管的形成

肿瘤血管、淋巴管的生成与侵袭转移密切相关, 其生成很大程度上受血管生成因子的调节, 其中血管内皮生长因子(VEGF)被认为是最重要的血管生成因子之一, 它能够促进血管内皮细胞的生长、增殖和迁移。VEGF 在大多数恶性肿瘤均表达增加, 并诱导肿瘤血管、淋巴管新生, 促进肿瘤生长、转移。*Twist* 能够调控血管生成相关分子的表达, 诱导肿瘤血管、淋巴管生成, 增加肿瘤侵袭力, 使肿瘤更容易转移。有对肝癌研究发现, 肝癌中表达 *Twist* 的组织微血管密度大于无 *Twist* 表达的组织, *Twist* 的表达与 VEGF 和 N-cadherin 的上调呈正相关, *Twist* 上调与肝内肝外转移显著相关^[39]。Gerecht-Nir 等^[40]应用芯片杂交和聚类分析方法研究胚胎干细胞发育过程中与血管分化相关的基因表达情况, 发现 *Twist* 在胚胎干细胞发育过程中与血管生成相关分子 VEGF-A、

VEGF-C、FIGF、An G1、An G2、TGF β 、PDGF β 等的基因同步开放, 提示 *Twist* 有可能参与了这些分子的调控。*Twist* 基因还可以参与多种信号通路包括 Wnt 信号通路的调节。而 VEGF 是 Wnt 信号通路中的下游分子, 因而 *Twist* 上调可能通过 Wnt 通路增强了 VEGF 的表达^[41-43]。

Mironchik 等^[44]指出, 在乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞的研究中发现, 稳定高表达 *Twist* 的乳腺癌细胞形态发生纤维样改变, 细胞极性紊乱, 黏附性降低。转染 *Twist* 正义基因的乳腺癌细胞系 MCF-7 / *Twist* 较空载体转染的乳腺癌细胞分泌 VEGF 明显增加, 接种肿瘤细胞到裸鼠体内形成肿瘤后进行功能性磁共振显像, 可见 MCF-7/*Twist* 组肿瘤内血管体积和渗透性高于对照组, 直接说明了 *Twist* 能够调控血管生成相关分子的表达, 从而诱导肿瘤血管生成。在乳腺癌组织标本中, *Twist* 上调还可增强 VEGF 表达, 促进血管生成, 并提高染色体的不稳定性, 促进肿瘤侵袭转移。

张等^[45]发现 *Twist*、VEGF 在肺癌组织及血清中高表达, 且血清中 *Twist* 和 VEGF 的表达与肺癌 TNM 分期、有无淋巴结转移相关, 与患者性别、年龄、肿瘤病理类型无关; *Twist* 和 VEGF 分别在血清及肿瘤组织中的表达呈正相关, 并且两者之间在血清中的表达呈正相关, 说明 *Twist* 通过调控 VEGF 的表达促进肿瘤血管的形成, 增加肺癌细胞的侵袭力及迁移能力。

3 讨论

恶性肿瘤是目前人类第二位的死亡原因, 肿瘤转移是恶性肿瘤致死的关键因素, 也是恶性肿瘤难以治愈的重要原因。*Twist* 在多种恶性肿瘤中高表达, 有研究表明^[29]: *Twist* 表达上调可能引起肺泡上皮和支气管黏膜上皮向肿瘤转化, *Twist* 可能成为肺癌发生发展的预后指标。*Twist* 相关因子的表达水平可能反应肿瘤组织的表达状况, 检测血清中 *Twist* 相关因子有可能代替肿瘤组织的检测, 给临床提供早期诊断、治疗及判断预后的依据。*Twist* 在多种上皮来源肿瘤细胞的上皮间充质转化(EMT)过程及调控肿瘤血管、淋巴管的生成等过程起重要作用, 为恶性肿瘤的治疗和药物研究提供了广阔的前景。但是

目前仍有很多问题待解决,如 Twist 的信号通路、与其他信号转导途径之间的交流和关系,调节的新的靶基因的发现等。随着对 Twist 与 EMT 及肿瘤侵袭与转移的深入研究,更多关于其在肿瘤转移中的机制也将相继阐明,以 *Twist* 基因为靶点的治疗可能成为阻止恶性肿瘤转移的一个新的重要手段。

参考文献:

- [1] Thisse B, el 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.
- [2] Sokol NS, Ambros V. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(19): 2343–2354.
- [3] Li L, Cserjesi P, Olson EN. Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis [J]. *Dev Biol*, 1995, 172(1): 280–292.
- [4] Guenou H, Kaabeche K, Dufour C, et al. Down-regulation of ubiquitin ligase Cbl induced by twist haploinsufficiency in Saethre-Chotzen syndrome results in increased PI3K/Akt signaling and osteoblast proliferation [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(4): 1303–1311.
- [5] Littlewood TD, Evan GI. Transcription factors 2: helix-loop-helix [J]. *Protein Profile*, 1995, 2(6): 621–702.
- [6] Massari ME, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(2): 429–440.
- [7] Doedens A, Johnson RS. Transgenic models to understand hypoxia-inducible factor function [J]. *Methods Enzymol*, 2007, 435: 87–105.
- [8] Salerno P, Garcia-Rostan G, Piccinin S, et al. Twist1 plays a pleiotropic role in determining the anaplastic thyroid cancer phenotype [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(5): 772–781.
- [9] el Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, et al. Mutations of the Twist gene in the Saethre-Chotzen syndrome [J]. *Nat Genet*, 1997, 15(1): 42–46.
- [10] Gitelman I. Twist protein in mouse embryogenesis [J]. *Dev Biol*, 1997, 189(2): 205–214.
- [11] Chen ZF, Behringer RR. Twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis [J]. *Genes Dev*, 1995, 9(6): 686–699.
- [12] De Marco P, Raso A, Beri S, et al. A de novo balanced translocation t (7;12) (p21.2;p12.3) in a patient with Saethre-Chotzen-like phenotype downregulates TWIST and an osteoclastic protein-tyrosine phosphatase, PTP-oc [J]. *Eur J Med Genet*, 2011, 54(5): 478–483.
- [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): 79–89.
- [14] Zhang Z, Xie D, Wong YC, et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer [J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(4): 598–606.
- [15] Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, et al. Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(8): 1634–1640.
- [16] Luo GQ, Li JH, Wen JF, et al. Effect and mechanism of the Twist gene on invasion and metastasis of gastric carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(16): 2487–2493.
- [17] Liu AN, Zhu ZH, Chang SJ, et al. Twist expression associated with the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 367(1–2): 195–203.
- [18] Gort EH, Suijkerbuijk KP, Roothaan SM, et al. Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(12): 3325–3330.
- [19] Xiao XS, Li YZ. Progression of twist gene [J]. *Medical Recapitulate*, 2009, 15(7): 1031–1034. [肖雄升, 李有柱. Twist 基因的研究进展 [J]. *医学综述*, 2009, 15(7): 1031–1034.]
- [20] Zhou ML, Yang JJ, Tang SF, et al. Overexpression of Twist gene promotes cancer stem-like cell enrichment and cell migration ability in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2014, 36(20): 2083–2086. [周明莉, 杨佳佳, 唐石伏, 等. 高表达 Twist 基因促进人乳腺癌细胞 MCF-7 干细胞样细胞富集和迁移 [J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(20): 2083–2086.]
- [21] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6): 453–458.
- [22] Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework [J]. *Cell*, 2006, 127(4): 679–695.
- [23] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57–70.
- [24] Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen

- gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. *J Cell Biol*, 1982, 95(1): 333-339.
- [25] 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.
- [26] Vernon AE, LaBonne C. Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(17): 719-721.
- [27] Puisieux A. Role of epithelial-mesenchymal transition in tumor progression [J]. *Bull Acad Natl Med*, 2009, 193(9): 2017-2032.
- [28] Kang Y, Massague J. Epithelial-Mesenchymal transitions: twist indevelopment and metastasis [J]. *Cell*, 2004, 118(3): 277-279.
- [29] Hui LP. High expression of twist is positively correlated with the differentiation of lung cancer [J]. *Chin J Lung Cancer*, 2009, 12(4): 294-299. [惠林萍. Twist 在肺癌中高表达并于肺癌分化有关 [J]. *中国肺癌杂志*, 2009, 12(4): 294-299.]
- [30] Zhang H, Shu H, Jiang WG. Relationship between expression of Twist and KiSS-1 and prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *China Oncology*, 2009, 19(11): 816-820. [张洪, 舒红, 姜卫国. Twist 与 KiSS-1 在非小细胞肺癌中的表达及其对预后的影响 [J]. *中国癌症杂志*, 2009, 19(11): 816-820.]
- [31] Lili LN, Matyunina LV, Walker LD, et al. Molecular profiling supports the role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in ovarian cancer metastasis [J]. *J Ovarian Res*, 2013, 6(1): 49.
- [32] Sun JJ, Wei L, Zhang DX, et al. Expression of twist in non-small cell lung and its role in epithelial-mesenchymal transition [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2014, 21(16): 1258-1261. [孙菊杰, 魏玲, 张德贤, 等. 非小细胞肺癌 Twist 表达与 EMT 相关性分析 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(16): 1258-1261.]
- [33] Nakashima H, Hashimoto N, Aoyama D, et al. Involvement of the transcription factor twist in phenotype alteration through epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 2012, 51(5): 400-410.
- [34] Shen X. Overexpression of twist genes inducing lung adenocarcinoma NCI-H1299 cells EMT and the impact on proliferation, migration and invasion [D]. Shanghai: Fudan University, 2013.41-44. [沈啸. 过表达 Twist 基因诱导肺腺癌 NCI-H1299 细胞 EMT 及其对增殖、迁移及侵袭能力的影响 [D]. 上海: 复旦大学, 2013.41-44.]
- [35] Fu J, Qin L, He T, et al. The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis [J]. *Cell Res*, 2011, 21(2): 275-289.
- [36] Smit MA, Gerger TR, Song JY, et al. A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-Like transformation, anoikis resistance, and metastasis [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(13): 3722-3737.
- [37] Casas E, Kim J, Bendesky A, et al. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(1): 245-254.
- [38] Zhang JX, Wang LM, Hu JJ, et al. The effect of bone morphogenetic protein-2 on epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells and its related mechanism [J]. *Tumor*, 2014, 34(9): 771-780. [张景熙, 王录美, 胡晶晶, 等. 骨形态发生蛋白-2 促进人肺癌细胞上皮-间质样转化及机制的研究 [J]. *肿瘤*, 2014, 34(9): 771-780.]
- [39] Niu GF, 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.
- [40] Gerecht-Nir S, Dazard JE, Golan-Mashiach M, et al. Vascular gene expression and phenotypic correlation during differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Dev Dyn*, 2005, 232(2): 487-497.
- [41] Goodwin AM, D'Amore PA. Wnt signaling in the vasculature [J]. *Angiogenesis*, 2002, 5(1-2): 1-9.
- [42] Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the wnt and k-ras pathways in colonic neoplasia [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16): 6050-6054.
- [43] Holthener W, Pillinger M, Gronger M, et al. Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(48): 45847-45853.
- [44] 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.
- [45] Zhang L, Yang H, Han J. Expression of Twist, VEGF in the tissue and serum of lung cancer patients [J]. *Sichuan Medical Journal*, 2015, 36(4): 460-463. [张凌, 颜浩, 韩娟. Twist、VEGF 在肺癌患者组织及血清中的表达 [J]. *四川医学*, 2015, 36(4): 460-463.]