

引用本文:王红,王恳,焦庆昉,等.YAP干扰腺病毒载体对宫颈癌增殖、迁移及侵袭的影响[J].安徽医药,2021,25(6):1136-1139.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.06.018.

◇临床医学◇



YAP干扰腺病毒载体对宫颈癌增殖、迁移及侵袭的影响

王红¹,王恳¹,焦庆昉¹,杨万全¹,张镇¹,李婕婷¹,吴扶生¹,王瑾²

作者单位:¹四川省中西医结合医院肿瘤科,四川 成都610041;

²中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院血液科,河南 洛阳471003

摘要: **目的** 探索YAP蛋白对宫颈癌细胞的恶性增殖、迁移及侵袭性的作用。**方法** 分别以腺病毒靶向YAP干扰载体(pAd-si-YAP)、重组空载体腺病毒(pAd-mock)或磷酸缓冲盐溶液(PBS)感染CaSki细胞。采用定量聚合酶链反应(qPCR)、蛋白质印迹法(Western blotting)、四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)、流式细胞法、划痕试验以及细胞侵袭试验分别分析感染后CaSki细胞的YAP mRNA表达、YAP蛋白表达、细胞增殖活力、细胞周期及凋亡、细胞迁移能力以及细胞侵袭能力。**结果** qPCR结果显示Ad-si-YAP感染CaSki细胞的YAP mRNA表达明显低于pAd-mock感染的CaSki细胞及PBS处理的CaSki细胞[(22.01±0.24)比(80.12±0.31)、(84.18±0.22), $P<0.05$],表明Ad-si-YAP可以抑制YAP基因转录。蛋白质印迹法结果显示Ad-si-YAP感染CaSki细胞的YAP蛋白表达低于pAd-mock感染的CaSki细胞及PBS处理的CaSki细胞[(0.6±0.018)比(1.5±0.031)、(1.8±0.27), $P<0.05$]。MTT结果显示24 h后pAd-mock感染的CaSki细胞及PBS处理的CaSki细胞增殖明显快于Ad-si-YAP感染CaSki细胞($P<0.05$)。流式细胞结果显示通过沉默YAP后,CaSki细胞周期停滞于G0/G1期明显增加($P<0.05$),同时CaSki细胞增多($P<0.01$)。划痕试验发现沉默YAP后CaSki细胞的迁移能力下降[(40.01±0.16)比(81.02±0.22)、(86.04±0.31), $P<0.05$],说明YAP可以促进CaSki细胞迁移。细胞侵袭试验发现沉默YAP后CaSki细胞的侵袭能力下降[(120±4)比(640±3)、(680±4), $P<0.05$]。**结论** YAP蛋白的表达可导致宫颈癌细胞的恶性增殖、迁移及侵袭,是应用于宫颈癌综合治疗的一个潜在靶点。

关键词: 子宫肿瘤; YAP; Hippo信号通路; CaSki细胞; 恶性增殖; 迁移; 侵袭

Effect of adenovirus-mediated silencing of YAP on the proliferation, migration, and invasion of cervical carcinoma

WANG Hong¹, WANG Ken¹, JIAO Qingfang¹, YANG Wanquan¹, ZHANG Zhen¹, LI Jieting¹, WU Fusheng¹,

WANG Jin²

*Author Affiliations:*¹Department of Oncology, Sichuan Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Chengdu, Sichuan 610041, China; ²Department of Hematology, The 989th Hospital of the Joint Logistic Support Force of the People's Liberation Army, Luoyang, Henan 471003, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of adenovirus-mediated YAP-silencing system (pAd-si-YAP) on the malignant proliferation, migration, and invasion of cervical carcinoma. **Methods** pAd-si-YAP, mock-recombinant adenovirus (pAd-mock), and phosphate buffer saline (PBS) were transfected into CaSki cell lines. The YAP mRNA/protein expression level, the cell proliferative potential, the cell cycle and apoptosis, and the migration/invasive potential of the transfected CaSki cell lines were determined by using quantitative polymerase chain reaction (qPCR), Western blotting, MTT assay, flow cytometry, wound healing assay, and Transwell assay, respectively. **Results** In this experiment, qPCR indicated that CaSki cells transfected with Ad-si-YAP showed a significantly lower YAP mRNA expression level compared to those transfected with pAd-mock or treated with PBS[(22.01±0.24) vs. (80.12±0.31), (84.18±0.22), $P<0.05$]. Western blotting indicated that CaSki cells transfected with Ad-si-YAP showed a significantly lower YAP protein expression level compared to those transfected with pAd-mock or treated with PBS[(0.6±0.018) vs. (1.5±0.031), (1.8±0.27), $P<0.05$]. MTT assay indicated that CaSki cells transfected with pAd-mock or treated with PBS proliferated more rapidly compared to those transfected with Ad-si-YAP ($P<0.05$). Flow cytometry indicated that YAP silencing caused more CaSki cells to arrest at the G0/G1 phase ($P<0.05$) and resulted in a higher cell count ($P<0.01$). Wound healing assay revealed a decrease in the migration potential of the CaSki cells after YAP silencing[(40.01±0.16) vs. (81.02±0.22), (86.04±0.31), $P<0.05$]. Transwell assay revealed a decrease in the invasive potential of the CaSki cells after YAP silencing[(120±4) vs. (640±3), (680±4), $P<0.05$]. **Conclusions** The expression of YAP protein can induce malignant proliferation, migration, and invasion of cervical carcinoma cells, and it is a potential target for the comprehensive treatment of cervical carcinoma.

Key words: Uterine neoplasms; YAP; Hippo signaling pathway; CaSki cells; Malignant proliferation; Migration; Invasion

宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一,全世界范围内宫颈癌的新确诊病例超过 52.98 万/年,是妇女癌症死亡的主要原因之一,其中大部分病人集中在发展中国家^[1]。目前手术、化疗及放疗是治疗宫颈癌的主要手段,但大部分病人仍发生复发转移,导致大部分病人的生存率无明显提高^[2]。Yes-associated protein (YAP) 是 Hippo 信号通路下游的转录激活因子,YAP 蛋白参与了肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭过程,在肿瘤发展过程中发挥重要作用^[3]。本团队于 2017 年 7 月至 2018 年 10 月利用腺病毒靶向 YAP 干扰载体(pAd-si-YAP),了解 YAP 蛋白对宫颈癌细胞的恶性增殖及侵袭性的作用,为全方面了解宫颈癌的分子生物学机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 pAd-si-YAP、重组空载体腺病毒(pAd-mock)均由中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院构建。人宫颈癌 CaSki 细胞株由中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院保存。DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 HyClone 公司;Transwell 培养板购自美国 Gibco 公司;鼠抗人 β 肌动蛋白(β -actin)及 YAP 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;RNase、碘化丙啶购自上海碧云天生物技术有限公司。荧光定量聚合酶链反应(qPCR)引物由 TaKaRa 公司合成,测序也由该公司完成。

1.2 细胞培养及细胞感染 配置好含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素细胞培养液,将 CaSki 细胞置于 37 °C、5% 二氧化碳细胞孵箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。将 CaSki 细胞接种于 6 孔板中,待密度约为 80% 时,取二孔细胞计数后,加入 200 感染复数(MOI)的重组腺病毒 pAd-si-YAP 及无血清的 DMEM,感染 2 h 后,1 000 r/min×5 min 离心后弃上清,加入含有血清的 DMEM 完全培养液;取二孔细胞计数后,加入 200 MOI 的 pAd-mock 及无血清的 DMEM,感染 2 h 后,1 000 r/min×5 min 离心后弃上清,加入含有血清的 DMEM 完全培养液。另取二孔细胞计数后,加入磷酸缓冲盐溶液(PBS)作为空白对照。由于腺病毒载体中含有编码的绿色荧光蛋白(GFP)基因,因此可在荧光显微镜下观察感染效率情况。待 CaSki 细胞感染 48 h 后,随机选择 6 个视野计数,在荧光显微镜下观察病毒感染情况,计算绿色荧光细胞占全部细胞的比例。

1.3 qPCR 检测 YAP mRNA 的表达 收集培养 48 h 的感染细胞及正常 CaSki 细胞,利用 Trizol 法提取

CaSki 细胞的总 RNA,进行 qPCR 并进行定量。根据 GeneBank 中 YAP 及 β -actin 设计引物并由 TaKaRa 公司合成。YAP 正向引物 5'-CCG CAA CTG CAG ATG GAG AC-3',反向引物 5'-CCA TCC CGG GAG AAG ACA CA-3', β -actin 正向引物 5'-CCT CGT CCC CTA CAT CGT-3',反向引物 5'-GAC GGT GTA GCC CCA CGA AA-3'。qPCR 反应条件:95 °C 变性 1 min,60 °C 30 s,58 °C 35 s,72 °C 50 s,33 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。

1.4 蛋白质印迹法(Western blotting)检测 YAP 蛋白表达 CaSki 细胞感染重组腺病毒 Ad-si-YAP 及 pAd-mock 48 h 后,收集细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白样品加样 60 微克/孔,电泳、转膜、封闭,然后加入一抗 4 °C 过夜,后 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次洗膜 10 min 后,再与 HRP 标记的二抗(1:3 000 稀释,即 3 mL 牛奶中加 1 μ L 二抗),室温下孵育 1 h。后再予 TBST 缓冲液洗涤 3 次后,应用 ECL 化学发光剂检测目的蛋白表达并进行半定量分析。

1.5 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)检测细胞增殖活力 根据“1.2”方法制备 Ad-si-YAP 及 pAd-mock 感染细胞,计数约 10 000 个细胞/孔接种于 96 孔板,后放回细胞孵箱中继续培养,分别于接种后 24、36、48、60 h 取出一块 96 孔板,加入 20 μ L 6 g/L 的 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT),后继续孵育 4 h 后,弃上液,加入 150 μ L 的二甲基亚砷(DMSO),震荡约 15 min 后于酶标仪 560 nm 处测吸光度。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡 分别用 Ad-si-YAP 及 pAd-mock 感染细胞 48 h 后,收集细胞,加入 70% 乙醇固定,后放入 4 °C 冰箱过夜,后用 PBS 清洗,后加入核糖核酸酶 A(RNase A),在 37 °C 水浴 30 min,后碘化丙啶(PI)避光染色 30 min,后应用流式细胞仪分析细胞周期及凋亡。

1.7 划痕试验检测细胞迁移能力 CaSki 细胞以 3×10^5 密度接种于 6 孔板,当细胞生长密度达到 80%,用 10 μ L 小枪头行“一”字划痕,后丢弃培养基,PBS 轻轻清洗 3 次,后加入 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基,显微镜下观察并拍照,于此时记为 0 h,后继续培养 24 h,后在同一观察点观察划痕愈合情况,通过计算观察点划痕宽度平均值,计算划痕愈合率。划痕愈合率(%)=(0 h 划痕宽度—24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%。

1.8 细胞侵袭试验 取 24 孔板并加入 600 μ L 不含血清的 DMEM 培养基,将 Transwell 小室及侵袭小室

放入24孔板中,放入37℃细胞孵箱中平衡备用。接种CaSki细胞于6孔板中,经过12h培养后,分别予Ad-si-YAP及pAd-mock感染细胞12h,对照组予PBS处理,后用胰酶消化细胞呈悬液后,以每孔 $5 \times 10^4/200 \mu\text{L}$ 接种予经过平衡的处理的Transwell小室及侵袭小室,于37℃细胞孵箱中继续培养。24h后去除Transwell小室及侵袭小室中残液,于冰甲醛中固定15min,后予0.1%的结晶紫染色液中染色20min,PBS清洗后晾干,每孔随机取5视野于100倍镜下计数。

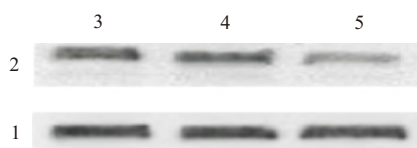
1.9 统计学方法 应用SPSS 19.0进行分析,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验进行分析,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pAd-si-YAP 及 pAd-mock 感染 CaSki 细胞 pAd-si-YAP感染效率为 $(93.1 \pm 2.4)\%$,pAd-mock感染效率为 $(92.8 \pm 3.1)\%$,见图1。

2.2 qPCR 检测 YAP mRNA 的表达 Ad-si-YAP感染CaSki细胞的YAP mRNA表达明显低于pAd-mock感染的CaSki细胞及PBS处理的CaSki细胞 $[(22.01 \pm 0.24)$ 比 (80.12 ± 0.31) 、 (84.18 ± 0.22)], $P < 0.05$],表明Ad-si-YAP可以抑制YAP基因转录。本实验重复3次。

2.3 蛋白质印迹法检测 YAP 蛋白表达 Ad-si-YAP感染CaSki细胞的YAP蛋白表达低于pAd-mock感染的CaSki细胞及PBS处理的CaSki细胞 $[(0.6 \pm 0.018)$ 比 (1.5 ± 0.031) 、 (1.8 ± 0.27)], $P < 0.05$],表明Ad-si-YAP可以干扰YAP基因表达。见图2。



注:1—β肌动蛋白(β-actin);2—YAP;3—PBS组;4—pAd-mock组;5—Ad-si-YAP组。

图2 蛋白质印迹法检测宫颈癌CaSki细胞YAP蛋白表达

2.4 MTT 法检测细胞增殖活力 24h后pAd-mock感染的CaSki细胞及PBS处理的CaSki细胞增殖明显快于Ad-si-YAP感染CaSki细胞($P < 0.05$),而pAd-mock感染的CaSki细胞相比PBS处理的CaSki细胞增殖趋势大致相同($P > 0.05$),说明沉默YAP基因可以抑制CaSki细胞增殖。见表1。

2.5 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡分析 本研究通过沉默YAP后,CaSki细胞周期停滞于G0/G1期明显增加($P < 0.05$),同时CaSki细胞增多($P <$

表1 MTT法检测宫颈癌CaSki细胞增殖活力(吸光度)结果/

组别	重复次数	$\bar{x} \pm s$			
		24 h	36 h	48 h	60 h
Ad-si-YAP	3	0.38±0.16	0.87±0.12	1.01±0.04	1.47±0.02
pAd-mock	3	0.95±0.05	1.18±0.07	1.65±0.06	2.48±0.03
PBS	3	1.01±0.03	1.49±0.05	1.99±0.04	2.88±0.02
F值		2.347	1.124	3.581	5.132
P值		0.006	0.004	0.007	0.003

0.01),而pAd-mock感染的CaSki细胞相比PBS处理的CaSki细胞周期分布及凋亡差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

表2 流式细胞仪检测CaSki细胞周期分布及凋亡结果/ ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	G0/G1期	G2/M期	S期	凋亡
Ad-si-YAP	3	55.3±1.6	14.3±1.5	22.4±1.3	5.7±0.6
pAd-mock	3	43.1±1.8	25.6±1.9	38.5±1.7	1.3±0.4
PBS	3	43.1±1.8	24.51±2.4	39.1±2.0	1.1±0.8
F值		1.235	2.013	2.101	2.121
P值		0.002	0.003	0.004	0.008

2.6 划痕试验检测细胞迁移能力 沉默YAP后CaSki细胞的划痕愈合占比下降 $[(40.01 \pm 0.16)\%$ 比 $(81.02 \pm 0.22)\%$ 、 $(86.04 \pm 0.31)\%$, $P < 0.05$],从而说明YAP可以促进CaSki细胞迁移。

2.7 细胞侵袭试验 沉默YAP后CaSki细胞的侵袭细胞数下降 $[(120 \pm 4)$ 个比 (640 ± 3) 个、 (680 ± 4) 个, $P < 0.05$],而pAd-mock感染的CaSki细胞及PBS处理的CaSki细胞,其侵袭力差异无统计学意义 $[(640 \pm 3)$ 个比 (680 ± 4) 个, $P > 0.05$],说明YAP可以提高CaSki细胞侵袭能力。

3 讨论

宫颈癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一,仅次于乳腺癌,占女性肿瘤第二位,严重威胁女性病人的生命,对社会及病人造成严重的负担^[4-5]。大部分病人确诊宫颈癌时,已经发生淋巴结及远处转移,而发生转移的病人预后很差^[6-7]。深入研究宫颈癌分子生物学特性,寻找更多潜在治疗靶点,是摆在肿瘤科研人员面前的重要课题。YAP基因位于染色体11q22区,被认为是一种原癌基因,其编码产生YAP蛋白,作为一种转录共激活因子,促进Hippo通路中的下游目的基因表达,从而促进细胞生长,抑制细胞凋亡,因此认为YAP基因为原癌基因。如果YAP异常活化,则YAP蛋白与转录因子TEAD相结

合促进基因转录,诱导上皮间质细胞转化,并增强细胞增殖,可抑制细胞凋亡,增强肿瘤细胞转移和侵袭能力^[8-12]。宫颈癌的发病机制极其复杂,目前认为是多因素、多基因、多阶段共同参与导致的结果,其中细胞信号传导通路对宫颈癌的发生、发展起着至关重要的作用^[13-14]。现发现,Hippo-YAP信号是众多信号通路中,调节宫颈癌形成的一条重要传导通路。YAP是Hippo通路中的核心效应因子,在机体内发挥胞内信号传导和转录调节等作用,而Hippo-YAP信号通路可调控机体器官的大小,调节肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等恶性行为,因而成为肿瘤研究中的热点^[15]。Liu等^[16]采用免疫组织化学方法分析检测120例宫颈鳞状细胞癌、42例宫颈腺癌、22例正常宫颈组织的YAP表达水平,同时对细胞质与细胞核中的YAP表达进行单独分析,发现YAP蛋白在肿瘤中表达水平明显高于正常组织,而李娜等^[17]则证明YAP蛋白表达越高,宫颈癌的恶性侵袭性越强,同时病情进展越快。

本团队在之前工作基础上将pAd-si-YAP转染CaSki细胞,发现Ad-si-YAP可以抑制CaSki细胞的YAP蛋白表达,同时发现沉默YAP基因后CaSki细胞的细胞周期发生改变,S期细胞比例减少,凋亡细胞增加,本团队拟下一步深入研究YAP蛋白与细胞周期蛋白之间的关系。肿瘤细胞的侵袭及转移机制,涉及多种信号转导通路以及肿瘤微环境的相互作用^[7,18],本研究发现沉默YAP基因后CaSki细胞的迁移能力及侵袭能力相对于对照组均有不同程度下降,本团队下一步将进一步研究Hippo-YAP通路的具体作用机制及其如何与其他信号通路相互作用,为全方面了解宫颈癌的分子生物学机制提供依据,以期对宫颈癌综合治疗及Hippo信号传导通路的调节提供一个潜在靶点。

(本文图1见插图6-4)

参考文献

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] MEIJER CJ, SNIJDERS PJ. Cervical cancer in 2013: screening comes of age and treatment progress continues [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2014, 11(2): 77-78.
- [3] HE C, MAO D, HUA G, et al. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression [J]. EMBO Mol Med, 2015, 7(11): 1426-1449.
- [4] TSIKOURAS P, ZERVOUDIS S, MANAV B, et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging [J]. J BUON, 2016, 21(2): 320-325.
- [5] RERUCHA CM, CARO RJ, WHEELER VL. Cervical cancer screening [J]. Am Fam Physician, 2018, 97(7): 441-448.
- [6] ZHANG W, HE W, SHI Y, et al. High expression of KIF20A is associated with poor overall survival and tumor progression in early-stage cervical squamous cell carcinoma [J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0167449. DOI: 10.1371/journal.pone.0167449.
- [7] VARMA KR, DABBS DJ. Cervical carcinoma with divergent neuroendocrine and gastrointestinal differentiation case reports [J]. Int J Gynecol Pathol, 2018, 37(5): 488-491.
- [8] ELBEDIWY A, VINCENT-MISTIAEN ZI, SPENCER-DENE B, et al. Integrin signalling regulates YAP and TAZ to control skin homeostasis [J]. Development, 2016, 143(10): 1674-1687.
- [9] ROULEAU C, PORES FERNANDO AT, HWANG JH, et al. Transformation by polyomavirus middle t antigen involves a unique bimodal interaction with the Hippo effector YAP [J]. J Virol, 2016, 90(16): 7032-7045.
- [10] LIU H, DU S, LEI T, et al. Multifaceted regulation and functions of YAP/TAZ in tumors (Review) [J]. Oncol Rep, 2018, 40(1): 16-28.
- [11] JANG W, KIM T, KOO JS, et al. Mechanical cue-induced YAP instructs Skp2-dependent cell cycle exit and oncogenic signaling [J]. EMBO J, 2017, 36(17): 2510-2528.
- [12] KULKARNI M, TAN TZ, SYED SULAIMAN NB, et al. RUNX1 and RUNX3 protect against YAP-mediated EMT, stem-ness and shorter survival outcomes in breast cancer [J]. Oncotarget, 2018, 9(18): 14175-14192.
- [13] TENG F, RUAN HJ, XU J, et al. RBBP6 promotes human cervical carcinoma malignancy via JNK signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 399-405.
- [14] ZHENG HY, SHEN FJ, TONG YQ, et al. PP2A inhibits cervical cancer cell migration by dephosphorylation of p-JNK, p-p38 and the p-ERK/MAPK signaling pathway [J]. Curr Med Sci, 2018, 38(1): 115-123.
- [15] NGUYEN Q, ANDERS RA, ALPINI G, et al. Yes-associated protein in the liver: regulation of hepatic development, repair, cell fate determination and tumorigenesis [J]. Dig Liver Dis, 2015, 47(10): 826-835.
- [16] LIU T, LIU Y, GAO H, et al. Clinical significance of yes-associated protein overexpression in cervical carcinoma: the differential effects based on histotypes [J]. Int J Gynecol Cancer, 2013, 23(4): 735-742.
- [17] 李娜, 李洪林, 尹利荣. HPV E6/E7 mRNA 与 YAP 在宫颈癌中的表达与相关性研究 [J]. 天津医科大学学报, 2018, 24(4): 301-311.
- [18] 王晓庆, 魏玮, 魏玺, 等. 甲状腺乳头状癌的超声表现及其与颈部中央区淋巴结转移的关系 [J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(3): 196-200.

(收稿日期: 2019-08-30, 修回日期: 2019-10-09)