



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.05.012
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3886.shtml

· 基础研究 ·

YAP 基因干扰对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响

孙献甫¹, 高全力², 孙淼淼³, 贺亚宁¹, 邵营波¹, 崔树德¹, 刘慧¹

(河南省肿瘤医院 / 郑州大学附属肿瘤医院 1. 乳腺科 2. 生物治疗科 3. 病理科, 河南 郑州 450008)

摘要

目的: 探讨干扰 YAP 基因的表达对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响。

方法: 通过逆转录病毒介导的方法, 分别用 YAP shRNA (实验组) 或阴性对照 shRNA (对照组) 转染 MCF-7 乳腺癌细胞, 用 qRT-PCR 和 Western blot 方法检测干扰效率; 溴脱氧核苷尿嘧啶 (BrdU) 结合实验和 MTT 法检测细胞增殖活性; 流式细胞术和 DAPI 染色检测细胞凋亡情况。

结果: 干扰效率检测显示, 转染 72 h 后, 实验组 MCF-7 细胞 YAP mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$), 同时 YAP 蛋白表达也明显下调; 细胞增殖检测显示, 与对照组比较, 实验组 MCF-7 细胞 BrdU 结合与 OD 值明显降低 ($P < 0.05$), 转染后 24、48、72 h 增殖抑制率分别为 19.1%、38.5%、53.5%; 凋亡检测显示, 实验组细胞凋亡率与凋亡细胞数较对照组明显增加 (均 $P < 0.05$)。

结论: 干扰 YAP 基因的表达能有效抑制乳腺癌细胞的增殖并促进凋亡, YAP 可能是乳腺癌潜在治疗靶点。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(5):624-628]

关键词

乳腺肿瘤; Yes 相关蛋白; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R737.9

YAP gene interference on proliferation and apoptosis in breast cancer cells

SUN Xianfu¹, GAO Quanli², SUN Miaomiao³, HE Yaning¹, SHAO Yingbo¹, CUI Shude¹, LIU Hui¹

(1. Galactophore Department 2. Department of Biotherapy 3. Department of Pathology, Henan Cancer Hospital Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China)

Corresponding author: LIU Hui, Email: 537039408@qq.com

ABSTRACT

Objective: To observe the influence of interference of Yes-associated protein (YAP) gene expression on proliferation and apoptosis in breast cancer cells.

Methods: Using a retrovirus-mediated method, breast cancer MCF-7 cells were transfected with YAP shRNA (experimental group) or negative control shRNA (control group), respectively. After that, the interference efficacy was evaluated via qRT-PCR and Western blot analysis, cell proliferative ability was determined by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay and MTT assay, and cell apoptosis was detected with flow cytometry and DAPI staining, respectively.

Results: Interference efficacy determination showed that YAP mRNA expression level was significantly decreased ($P < 0.05$), and YAP protein expression was also remarkably down-regulated in MCF-7 cells in experimental group compared with control group at 72 h after transfection. Cell proliferation assay showed that BrdU incorporation level and OD value in experimental group were significantly reduced compared with control group (both $P < 0.05$), and the ratio of proliferation inhibition in experimental group at 24, 48, 72 h after transfection was 19.1%, 38.5% and 53.5%, respectively. Cell apoptosis analysis showed that the apoptosis rate and number of apoptotic cells in experimental group were significantly increased compared with control group (both $P < 0.05$).

收稿日期: 2014-01-14; 修订日期: 2014-03-15。

作者简介: 孙献甫, 河南省肿瘤医院 / 郑州大学附属肿瘤医院主治医师, 主要从事乳腺癌综合治疗方面的研究。

通信作者: 刘慧, Email: 537039408@qq.com

Conclusion: Interference of YAP gene expression can effectively inhibit the proliferation and accelerate apoptosis in breast cancer cells, and YAP may probably a potential therapeutic target for breast cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(5):624-628]

KEYWORDS Breast Neoplasms; Yes-Associated Protein; Cell Proliferation; Apoptosis

CLC number: R737.9

乳腺癌是最常见危害女性健康的恶性肿瘤之一,近年来其发病率呈现明显上升且年轻化的趋势,已成为城市女性恶性肿瘤的首位^[1]。YAP (Yes-associated protein) 是一个 65 kD 富含脯氨酸的磷蛋白,位于染色体 11q22,许多研究证实其具有致癌活性, YAP 通过促进细胞增殖和抑制细胞凋亡导致肿瘤进展^[2]。在肝细胞癌、结肠腺癌、肺腺癌、乳腺癌和卵巢囊腺癌中都发现 YAP 蛋白在细胞核和胞浆强阳性染色^[3]。但目前有关 YAP 在乳腺癌中的功能研究较少,本课题拟通过逆转录病毒介导的 RNA 干扰技术下调乳腺癌细胞中 YAP 表达,检测肿瘤细胞增殖和凋亡变化,初步探讨 YAP 促进乳腺癌发生发展的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF-7 和人肾上皮细胞系 293T 购自于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。细胞培养于含 100 mL/L 胎牛血清 (Gibco, 美国)、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素 (Sigma, 美国) 的 DMEM 培养基 (Gibco, 美国) 中,置于 37 °C, 50 mL/L CO₂ 细胞培养箱中,饱和湿度下培养。稳定传代 2~3 代后,取对数生长期细胞进行实验。

1.2 逆转录病毒 YAP shRNA 包装和感染

5 × 10⁶ 个 293T 细胞种于 100 mm 培养皿,待细胞融合度达到 50%~70%,按照 Effectene[®] Transfection Reagent (Invitrogen, 美国) 说明书操作,将 2.0 μg pMMP-YAP shRNA 或阴性对照 shRNA、1.5 μg pMD.MLV 和 0.5 μg pVSV.G 质粒转染入 293T 细胞,转染后 48、72 h 分别收集病毒上清液。待 MCF-7 乳腺癌细胞融合达到 50% 左右,加入 3 mL 培养基和 1 mL 病毒上清液 (含 YAP shRNA 或阴性对照 shRNA) 以及 4 μL polybrene (8 μg/mL),细胞培养箱孵育过夜。病

毒感染后 48~96 h 进行下一步实验。

1.3 定量逆转录 - 聚合酶链反应 (qRT-PCR)

YAP 引物 (正向: 5'-CCT GCG TAG CCA GTT ACC AA-3'; 反向: 5'-CCA TCT CAT CCA CAC TGT TC-3')、β-肌动蛋白 (β-actin) 内参引物 (正向: 5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3'; 反向: 5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3') 均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。使用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, 美国) 提取细胞总 RNA,按照高效 cDNA 逆转录试剂盒 (Applied Biosystems, 美国) 说明书逆转录 2 μg 总 RNA,在 ABI 7300 系统中行 ABI TaqMan 基因表达分析 (Applied Biosystems, 美国)。各标本计算平均值,通过平均值计算相对含量, YAP mRNA 的相对表达量用 2^{-ΔΔCT} 法计算。

1.4 Western blot

兔抗人 YAP 多克隆抗体 (PA1-46189) 购自美国 Thermo Scientific 公司。取处理后的 MCF-7 乳腺癌细胞,弃培养基, PBS 冲洗 3 次后加入 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度。使用 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 110 V 电泳 1.5 h, 4 °C 条件下 110 V 电压湿转 1.5 h。5% 脱脂奶粉 (TBST 溶解) 室温封闭 10 min, 加入 1:1 000 稀释的 YAP 抗体, 4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗 5 min × 3 次, 加入 1:1 000 稀释的驴抗兔二抗, 室温孵育 2 h。TBST 漂洗 5 min × 3 次。暗室内浸入 ECL 液显色, 并使胶片曝光, 全自动 X 光洗片机洗片。

1.5 细胞增殖活性检测

细胞增殖能力检测, 将感染 YAP shRNA 或 NT shRNA 的 MCF-7 乳腺癌细胞按 5 000/孔种于 96 孔板中, 24 h 后按溴脱氧核苷尿嘧啶 (BrdU) 染色试剂盒 (Roche, 美国) 说明书操作, 分别加入 BrdU 溶液、固定液、二抗工作液和 TMB 底物, 最后应用酶标仪 450 nm 吸光度进行检测, 检测结果用相对发光单位 (relative light unit, RLU) 表示。噻唑蓝 (MTT) (Roche, 美国) 用于检测

MCF-7。乳腺癌细胞感染 YAP shRNA 或阴性对照 shRNA 后 24、48、72 h 细胞活力变化, 每孔加 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L, 继续避光培养 4 h, 弃上清, 每孔加 DMSO 150 μ L, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 20 min 至颗粒溶解, 于酶标仪上测定各孔 490 nm 的吸光度 OD 值。

1.6 细胞凋亡检测

MCF-7 乳腺癌细胞感染 YAP shRNA 或阴性对照 shRNA 72 h 后, 胰酶消化液解离细胞, 取 1×10^5 个细胞, 加入 500 μ L 的结合缓冲液。加入 5 μ L Annexin V-FITC, 再加入 10 μ L 碘化丙啶, 移液器轻轻吹打混匀。室温下避光反应 5~15 min, 在 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。将感染 YAP shRNA 或阴性对照 shRNA 的 MCF-7 乳腺癌细胞用 4% 福尔马林固定 15 min, PBS 冲洗 3 次, 加入 DAPI 染液避光作用 10 min, 置于荧光显微镜下 359 nm 激发光观察结果, 通过细胞计数评估细胞凋亡情况。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用成组 t 检验或 two-way ANOVA, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰效率检测

为检测逆转录病毒介导的 YAP shRNA 的干扰效率, MCF-7 细胞感染病毒 72 h 后 qRT-PCR 和 Western blot 检测 YAP mRNA 和蛋白表达变化, 结果显示: 与对照组比较, YAP shRNA 转染组细胞, YAP mRNA 表达量明显降低 [(0.22 ± 0.05) vs. (1.00 ± 0.00)], 差异有统计学意义 ($t=37.72$, $P < 0.001$); YAP 蛋白表达量也明显降低 (图 1)。

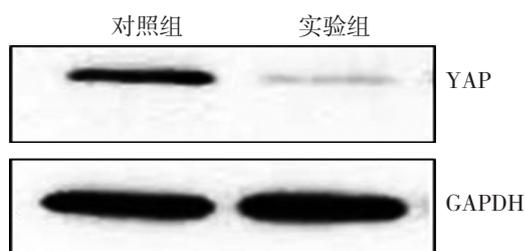


图 1 Western blot 检测 YAP 蛋白表达

Figure 1 Western blot analysis for YAP protein expression

2.2 YAP shRNA 对 MCF-7 细胞增殖能力的影响

转染 MCF-7 细胞 72 h 后, BrdU 结合实验检测显示: 实验组 RLU 明显低于对照组 [(55.8 ± 8.7) vs. (121.0 ± 7.8)], 差异有统计学意义 ($t=13.64$, $P < 0.001$) (图 2)。

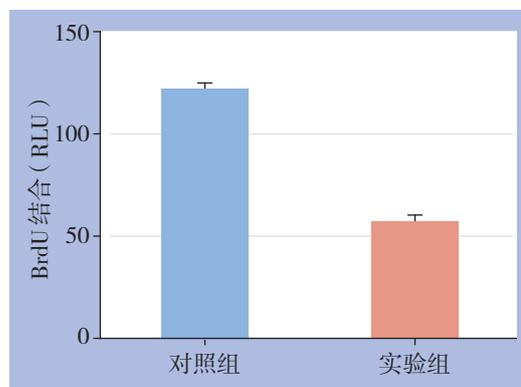


图 2 BrdU 结合实验检测细胞增殖

Figure 2 BrdU incorporation assay for cell proliferation

转染 MCF-7 细胞后, MTT 法检测 24、48、72 h 细胞增殖活性的变化, 结果显示: 与对照组比较, 实验组肿瘤细胞 OD 值明显降低, 差异均有统计学意义 (24 h: $t=4.928$, $P < 0.001$; 48 h: $t=18.53$, $P < 0.001$; 72 h: $t=40.74$, $P < 0.001$) (图 3); 实验组 24、48、72 h 抑制率分别为 0.191、0.385、0.535。

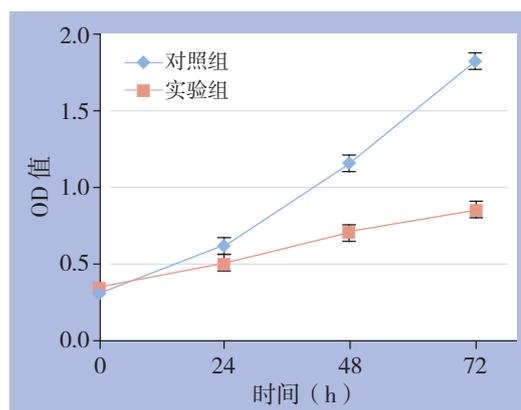


图 3 MTT 法检测细胞增殖

Figure 3 MTT assay for cell proliferation

2.3 YAP shRNA 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

转染 MCF-7 细胞 72 h 后, 流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡情况, 结果显示: 与对照组 (NT shRNA) 比较, 实验组肿瘤细胞凋亡率 (%) 明显

增加 [(31.1 ± 4.7) vs. (5.6 ± 1.9)], 差异有统计学意义 ($t=12.27, P<0.001$) (图 4A) ; 同时, MCF-7 细胞 DAPI 染色显示, 实验组凋亡细胞数明

显高于对照组 [(51.1 ± 4.7) vs. (20.1 ± 3.9)], 差异有统计学意义 ($t=10.27, P<0.001$) (图 4B) 。

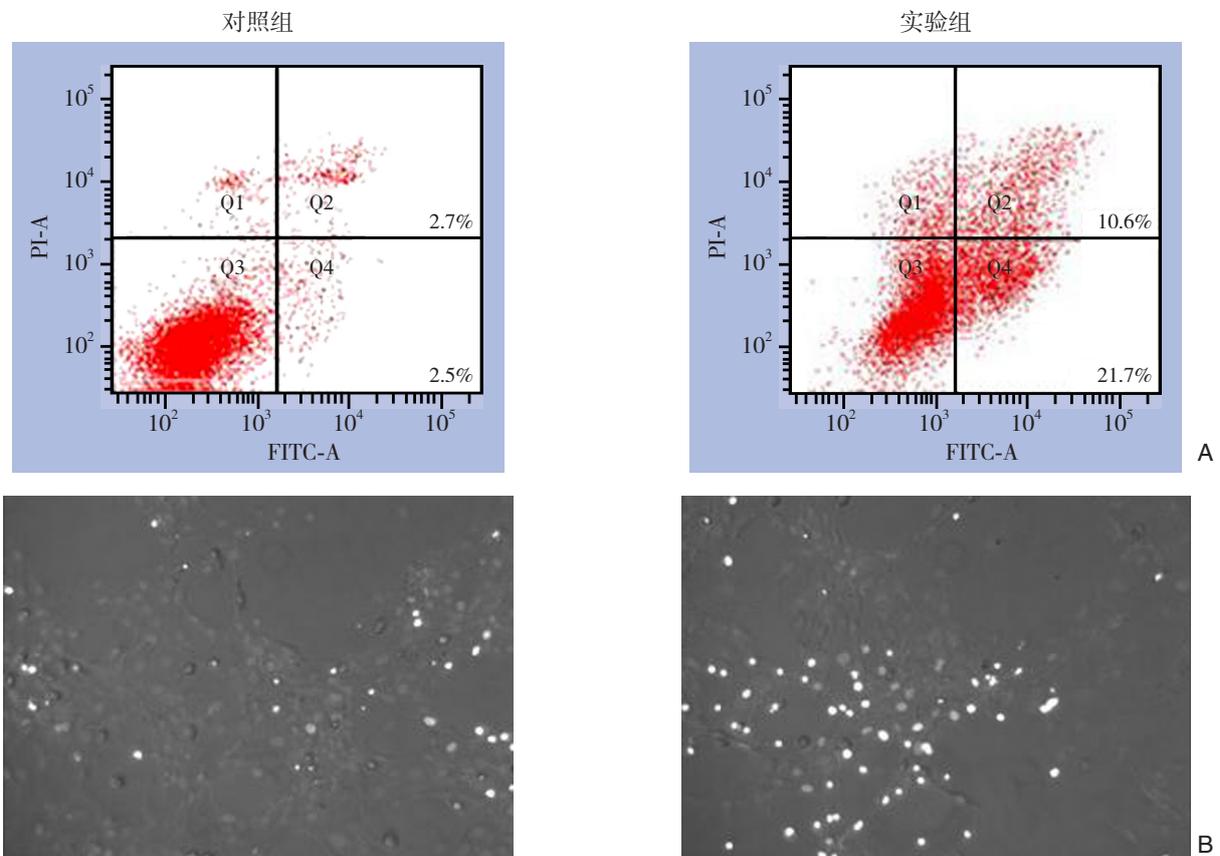


图 4 细胞凋亡检测结果 A: 流式细胞分析; B: DAPI 染色 (× 100)
 Figure 4 Cell apoptosis measurement A: Flow cytometry analysis; B: DAPI staining (× 100)

3 讨 论

Hippo 信号通路最初在果蝇中被发现, 其在哺乳动物中是一个高度保守有效的细胞生长和凋亡调控因子, Hippo 信号通路在胚胎发育过程中控制器官大小, 同时也被证实是一个新的肿瘤抑制基因通路^[4]。实质上, Hippo 信号级联反应的下游效应是通过细胞质扣留和蛋白质降解导致其效应分子 YAP 磷酸化和失活, Hippo 激酶通路被细胞与细胞接触活化并导致磷酸化依赖的丝氨酸 - 苏氨酸激酶级联活化, 其中包括磷酸化并活化 Lats 激酶的 Mst, 一旦 Lats 被活化, 其能够与一个小衔接蛋白 Mob 协同磷酸化 YAP 的 Ser127 位点, 从而启动 YAP 的细胞质停留和之后 14-3-3 蛋白介导的降解^[5], 而 Hippo 信号通路失调导致 YAP 蛋白脱磷酸化和核内蓄积。

在小鼠肝脏中 YAP 通过调控已知靶基因如 Ki-67、c-myc、SOX4 (sex-determining region Y-related high-mobility group box 4) 和 AFP 的转录促进增殖^[6]。使用综合的癌基因组学和蛋白质组学方法, 在肝癌和乳腺癌中 YAP 被鉴定为位于 11q22 扩增子的一个癌基因^[7]。而且肝脏定向过表达 YAP 的转基因小鼠出现肝脏体积明显增加并最终发生了肿瘤^[8]。最近的一项研究^[9]表明 YAP 过表达可以消除细胞接触抑制并促进细胞生长。在前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、食管癌和肝癌中存在 YAP 蛋白表达和核内蓄积增加^[10], 另外, YAP 的种内同源基因 - 含有 PDZ 结合域的转录辅助激活因子 (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ) 在 20% 的乳腺癌组织中过表达^[11]。

本研究通过逆转录病毒介导的 shRNA 靶向敲低 MCF-7 乳腺癌细胞中的 YAP 表达, BrdU 结合

实验和 MTT 检测发现下调 YAP 表达导致肿瘤细胞增殖和活力显著降低, 同时流式细胞术和 DAPI 染色发现下调 YAP 表达导致肿瘤细胞凋亡显著增加, 提示 YAP 可能作为一个促癌基因在乳腺癌发生发展中发挥重要作用。但是, 也有研究^[12]报道 YAP 通过辅助激活 p73 从而发挥促凋亡活性。有学者^[13]认为 YAP 在乳腺癌中是一种肿瘤抑制基因, 这可能与细胞特异性有关, 需要进一步体内基因学研究来证实。综上所述, 本研究发现 YAP 可能通过促进肿瘤细胞增殖和抑制凋亡导致乳腺癌进展, 其具体的分子机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王文忠, 郭慧. 乳腺浸润性导管癌中 CD74 的表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(5):633-637.
- [2] Zhou Z, Zhu JS, Xu ZP, et al. Lentiviral vector-mediated siRNA knockdown of the YAP gene inhibits growth and induces apoptosis in the SGC7901 gastric cancer cell line[J]. Mol Med Rep, 2011, 4(6):1075-1082.
- [3] Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, et al. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors[J]. Hum Pathol, 2008, 39(11):1582-1589.
- [4] Wang L, Shi S, Guo Z, et al. Overexpression of YAP and TAZ is an independent predictor of prognosis in colorectal cancer and related to the proliferation and metastasis of colon cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(6):e65539. doi: 10.1371/journal.pone.0065539.
- [5] Yu FX, Zhao B, Panupinhu N, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling[J]. Cell, 2012, 150(4):780-791.
- [6] Barry ER, Camargo FD. The Hippo superhighway: signaling crossroads converging on the Hippo/Yap pathway in stem cells and development[J]. Curr Opin Cell Biol, 2013, 25(2):247-253.
- [7] Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, et al. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33):12405-12410.
- [8] Zender L, Spector MS, Xue W, et al. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach[J]. Cell, 2006, 125(7):1253-1267.
- [9] Zhao B, Li L, Lei Q, et al. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version[J]. Genes Dev, 2010, 24(9):862-874.
- [10] Xu MZ, Yao TJ, Lee NP, et al. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2009, 115(19):4576-4585.
- [11] Oka T, Mazack V, Sudol M. Mst2 and Lats kinases regulate apoptotic function of Yes kinase-associated protein (YAP)[J]. J Biol Chem, 2008, 283(41):27534-27546.
- [12] Yuan M, Tomlinson V, Lara R, et al. Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(11):1752-1759.
- [13] Chan SW, Lim CJ, Guo K, et al. A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(8):2592-2598.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 孙献甫, 高全力, 孙森森, 等. YAP 基因干扰对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(5):624-628. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.05.012

Cite this article as: SUN XF, GAO QL, SUN MM, et al. YAP gene interference on proliferation and apoptosis in breast cancer cells[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(5):624-628. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.05.012