

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.08.1004

沉默 Yes 相关蛋白 1 对人非小细胞肺癌细胞增殖和侵袭的影响

蒋庚西, 李春光, 赵铁军, 李白翎, 张冠鑫, 陈和忠*

第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究 Yes 相关蛋白 1(YAP1)在非小细胞肺癌细胞增殖、细胞周期、迁移、侵袭中的作用。**方法** 通过慢病毒介导的小干扰 RNA 靶向抑制人非小细胞肺癌细胞株 A549 中 YAP1 基因的表达,采用 CCK-8 法、流式细胞术分别检测沉默 YAP1 对 A549 细胞增殖及凋亡周期的影响,Transwell 实验观察沉默 YAP1 对 A549 细胞迁移、侵袭能力的影响。**结果** 沉默 YAP1 后,A549 细胞 YAP1 mRNA 和蛋白表达均下调($P<0.01$),CCK-8 实验结果显示沉默 YAP1 抑制 A549 的增殖、增加 G_0/G_1 期的细胞比例($P<0.01$), Transwell 实验结果示沉默 YAP1 抑制 A549 细胞的迁移、侵袭 ($P<0.01$)。**结论** 沉默 YAP1 基因对非小细胞肺癌细胞的恶性生物学特征具有抑制作用,YAP1 可能成为肺癌治疗的潜在靶标。

[关键词] 肺肿瘤;非小细胞肺癌;Yes 相关蛋白 1;细胞增殖;细胞侵袭

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)08-1004-05

Effect of silencing of Yes-associated protein 1 gene on proliferation and invasion of human non-small cell lung cancer cells

JIANG Geng-xi, LI Chun-guang, ZHAO Tie-jun, LI Bai-ling, ZHANG Guan-xin, CHEN He-zhong*

Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the role of Yes-associated protein 1 (YAP1) in the proliferation, cell cycle, migration and invasion of human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods** A lenti-siRNA targeting YAP1 (si-YAP1) was used to inhibit the expression of YAP1 gene of human NSCLC cell line A549 cells. CCK-8 assay and flow cytometry were used to determine the effects of silencing of YAP1 expression on A549 cells proliferation and cell cycle, respectively; Transwell assay was used to observe the effect of silencing of YAP1 expression on A549 cell migration and invasion. **Results** After infection with si-YAP1, the expressions of YAP1 mRNA and protein in A549 cells were significantly down-regulated ($P<0.01$). YAP1 silencing significantly inhibited A549 cell proliferation, increased the percentage of cells in G_0/G_1 phase ($P<0.01$), and significantly decreased the migration and invasion of A549 cells ($P<0.01$). **Conclusion** YAP1 silencing can inhibit malignant biological characteristics of NSCLC, which suggests that YAP1 gene may serve as an important target in the gene therapy of lung cancer.

[Key words] lung neoplasms; non-small cell lung cancer; Yes-associated protein 1; cell proliferation; cell invasion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(8): 1004-1008]

肺癌目前仍然是世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占有支气管肺癌病理类型的80%以上,其恶性程度高,疾病进展快,5年生存率仅约11%^[1]。NSCLC 侵袭转移及多药耐药是其临床治疗的两大难点,也是影响患者预后、导致死亡的主要原因。因此,阐明 NSCLC 转移的分子机制对

其治疗和预后具有重要意义。

Yes 相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP1)是 Hippo 信号通路下游关键转录因子^[2-3]。Hippo/YAP1 通路是近年新发现的一条细胞信号传导通路,可通过调节组织细胞增殖和凋亡平衡调控机体器官的大小。该通路调控异常可导致多种疾病的发生^[2,4],包括多种恶性肿瘤,如肝癌^[5]、胆囊

[收稿日期] 2017-04-28 **[接受日期]** 2017-08-08

[作者简介] 蒋庚西,博士,主治医师. E-mail: jiang9909@hotmail.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161758, E-mail: drchenhz@163.com

癌^[6]、乳腺癌^[7]、肺癌^[8]、胰腺癌^[9]和食管癌^[10]等。目前认为 YAP1 基因可能是致癌基因,在许多肿瘤中高表达^[6,9-11]。例如, Li 等^[6]发现胆囊癌组织中 YAP1 及其靶蛋白 AXL 高表达,且该表达水平与不良预后相关。他们利用慢病毒载体介导的小干扰 RNA 沉默 YAP1 基因表达,通过减少细胞周期相关蛋白细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase 2, CDK2)、细胞分裂周期蛋白 25A (CDC25A)和细胞周期蛋白 A (cyclin A)的表达,致胆囊癌细胞停滞于 S 期,降低肿瘤细胞增殖;进一步的机制研究发现, AXL/MAPK 信号途径参与了 YAP1 相关的肿瘤进展。本研究通过慢病毒介导的 RNA 干扰靶向抑制人 NSCLC 细胞株 A549 中 YAP1 基因的表达,研究 YAP1 是否作为癌基因调控 NSCLC 细胞的增殖及细胞周期,并探讨 YAP1 基因对 A549 细胞迁移、侵袭能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 慢病毒靶向 YAP1 干扰载体 (si-YAP1)、慢病毒包裹的无关 RNA 载体 (si-NC) 均由中国人民解放军胸心外科研究所构建。人 NSCLC 细胞株 A549 购自中国科学院上海细胞库。小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, DMEM 培养液为美国 Gibco 公司产品, Transwell 培养小室购自美国 Millipore 公司, YAP1 抗体 (货号: 4912) 购自美国 CST 公司, RNase A、碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 及 GAPDH 抗体 (货号: SAB2701826) 购自美国 Sigma 公司, qPCR 引物由 TaKaRa 公司合成及测序。

1.2 细胞培养及细胞感染 A549 细胞所用培养液为含 10% 小牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 100 IU/mL 青霉素的 DMEM 培养液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 取对数生长期 A549 细胞进行细胞实验。A549 细胞接种于 24 孔培养板培养, 至密度约 80% 时, 根据随机数字表, 取 3 孔细胞计数, 按感染复数 (MOI) 为 150 加入慢病毒载体 si-YAP1 (设为实验组); 再取 3 孔细胞计数后, 按 MOI 为 150 加入无关病毒载体 si-NC (设为阴性对照组); 另取 3 孔细胞计数后, 加入 PBS (设为空白对照组)。根据预实验确定的感染条件, 利用滴度为 1×10^9 TU/mL 病毒原液 60 μL 与 polybrene 3 μL 感染数目为 1.5×10^5 的 A549 细胞。由于病毒质粒中含有编码的绿色荧

光蛋白 (GFP) 基因, 利用荧光显微镜可根据荧光强度估算细胞感染效率。以 293T 细胞作为参照。待 293T 细胞和各组 A549 细胞感染 48 h 后, 随机选择 5 个视野计数, 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, 即为感染效率。

1.3 qPCR 检测 YAP1 mRNA 的表达 本研究所用 YAP1 引物及 β actin 引物序列根据文献^[12]设计, 由 TaKaRa 公司合成。引物序列: YAP1 正向引物 5'-CAG CAA CTG CAG ATG GAG AA-3', 反向引物 5'-ACA TCC CGG GAG AAG ACA CT-3'; β actin 正向引物 5'-CGT CTT CCC CTC CAT CGT-3', 反向引物 5'-GAA GGT GTG GTG CCA GAT TT-3'。利用 TRIzol 试剂提取各组 A549 细胞的总 RNA, 经反转录反应得到 cDNA 后再采用 TaqMan 法进行 qPCR 反应并定量。qPCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共 32 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 min。

1.4 蛋白质印迹法分析 YAP1 蛋白的表达 A549 细胞经慢病毒感染 72 h 后, 收集细胞, 用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白, 测定蛋白浓度。蛋白样品加样 (50 $\mu\text{g}/\text{孔}$)、电泳、转膜、封闭, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜标记一抗 YAP1 (1 : 1 000 比例稀释) 和 GAPDH (1 : 2 000 比例稀释)。用 TBST 洗膜 3 次 (10 min/次), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 标记相应二抗, 再用 TBST 洗膜 3 次 (10 min/次)。曝光、显影及定影, 扫描 X 线胶片, 进行半定量分析。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖能力 慢病毒感染各组 A549 细胞 72 h 后, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 再用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液稀释成密度为 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液, 按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 接种于 96 孔培养板, 每个样本设 3 个复孔。细胞接种后水平放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养。于细胞接种后 24、48、72、96、120 h 各取出一块 96 孔板, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养 2 h, 待形成的 Formazan 的量显色足够时, 在酶标仪上测定 450 nm 处的光密度 (D) 值, 绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测细胞周期 待各组 A549 细胞处于对数生长期后, 收集细胞, 铺板, 每组 3 复孔, 每孔 100 μL (细胞数约为每孔 2 000)。各组细胞经慢病毒处理 48 h 后, 待细胞贴壁, 收集细胞, 加入 70% 冷乙醇, 使细胞固定, 过夜后用 PBS 清洗 1 次,

再加入RNase A 在 37 °C 水浴中消化 30 min,PI 避光染色 30 min,上流式细胞仪进行细胞周期分布检测,并计算凋亡期细胞所占比例。

1.7 Transwell 实验体外检测细胞侵袭能力 体外侵袭实验采用美国 Millipore 公司的聚碳酸酯膜(8 μm 孔径)侵袭小室,以无血清 DMEM 培养液稀释 Matrigel 胶,使之浓度达 4.0 μg/μL,并铺到 Transwell 上室,放在 37 °C 孵育箱中,经 30 min 后 Matrigel 胶聚合成凝胶,进而成为基底膜。接着,在 Transwell 下室加入含 5 g/mL 纤维粘连蛋白(FN)的 DMEM 培养液,上室加入 si-YAP1 组或 si-NC 组细胞 500 μL (细胞密度约 10⁶/mL),每组设 3 个复孔;在 37 °C 孵育箱培养 1 d 后,丢弃上室培养液,取出上室,用湿棉签轻轻拭去未穿过膜的细胞,经 0.1% 结晶紫染色、PBS 洗涤、风干后,用 Clearmont 双侧封片,放入 80 °C 烤箱中烤干,利用荧光倒置显

微镜观察拍照(100 倍视野下)。计数方法为:在每张膜中央和周围部分各随机取 3 个视野,计数每个视野内穿膜的细胞数。实验重复 3 次。细胞数越多,表示细胞侵袭能力越强。

1.8 统计学处理 所有数据应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 慢病毒干扰 A549 细胞中 YAP1 表达的验证 本研究中 293T 细胞和 A549 细胞的感染效率分别为(92.0±6.2)%和(81.0±3.6)% (图 1A)。分别收集感染 48 h 的 si-YAP1 组及 si-NC 组细胞,进行 qPCR(图 1B)和蛋白质印迹法(图 1C)检测,结果显示干扰 YAP1 后 YAP1 mRNA 及蛋白的表达均低于 si-NC 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

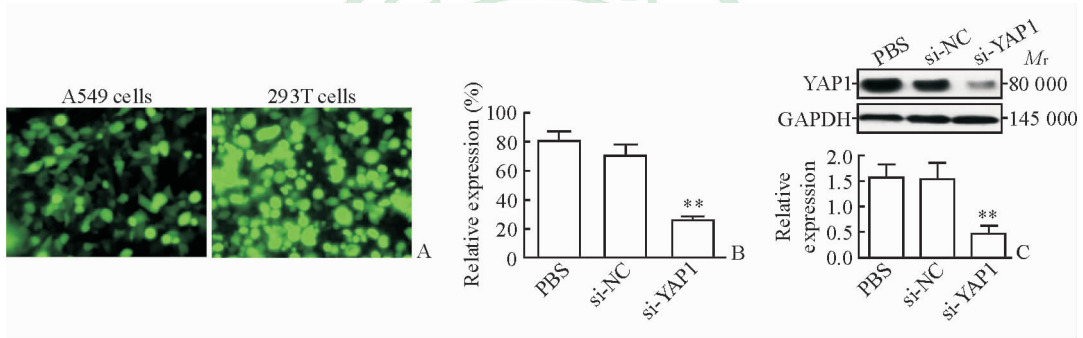


图 1 慢病毒干扰 A549 细胞 YAP1 表达的验证结果

Fig 1 Lentivirus-mediated siRNA stably decreased YAP1 expression in A549 cells

A: Infection efficiency in A549 cells was estimated by fluorescent micrograph (original magnification: ×200); B: qPCR was used to assay YAP1 mRNA expression in A549 cell lines; C: Infection efficiency in A549 cells was estimated by Western blotting analysis. YAP1: Yes-associated protein 1. ** $P < 0.01$ vs si-NC group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 靶向 RNA 干扰 YAP1 后 A549 细胞的增殖情况 为了检测 YAP1 对 A549 细胞增殖的影响,我们采用 CCK-8 试剂盒比较干扰 YAP1 的表达后 A549 细胞的增殖情况。从 24 h 后 si-NC 组细胞增殖开始快于 si-YAP1 组,72 h 后两组差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$;图 2),说明下调 YAP1 的表达能够抑制 A549 细胞的增殖。

2.3 沉默 YAP1 对 A549 细胞周期及凋亡的影响 为了解沉默 YAP1 对 A549 细胞周期的影响,本研究将 si-YAP1 组及 si-NC 组的细胞周期进行比较。结果如表 1 所示,沉默 YAP1 后,A549 细胞周期停滞于 G₀/G₁ 的细胞较 si-NC 组增加($P = 0.001$),而 S 期($P = 0.041$)及 G₂/M 期($P = 0.009$)

的细胞与 si-NC 组相比均减少;沉默 YAP1 后 A549 细胞凋亡较 si-NC 组也增加($P < 0.001$)。

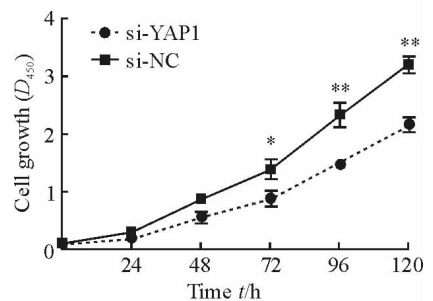


图 2 靶向沉默 YAP1 对 A549 细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of YAP1 silencing on A549 cell proliferation

YAP1: Yes-associated protein 1. * $P < 0.05, ** P < 0.01$ vs si-YAP1 group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

表 1 靶向沉默 YAP1 对细胞周期的影响

Tab 1 Effect of YAP1 silencing on A549 cell cycle progression

Cell cycle	si-NC	si-YAP1	<i>P</i> value
	%, <i>n</i> =3, $\bar{x}\pm s$		
G ₀ /G ₁ phase	40.3±3.8	53.4±4.1	0.001
G ₂ /M phase	23.8±3.0	15.4±1.9	0.009
S phase	36.6±1.2	28.0±3.2	0.041
Apoptosis	0.5±0.5	3.2±1.1	<0.001

YAP1: Yes-associated protein 1

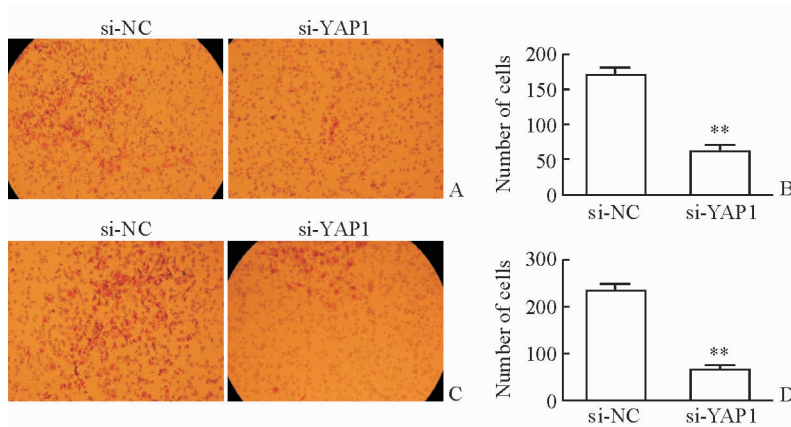


图 3 靶向沉默 YAP1 对 A549 细胞侵袭 (A, B) 及迁移 (C, D) 能力的影响

Fig 3 Effect of YAP1 silencing on invasion (A, B) and migration (C, D) of A549 cells

YAP1: Yes-associated protein 1. Original magnification: $\times 100$ (A, C). ** $P < 0.01$ vs si-NC group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

Hippo/YAP1 是近年来发现的可通过调节细胞增殖和凋亡平衡, 调控器官体积的信号分子转导通路。近年研究表明, Hippo/YAP1 信号通路转导异常与多种疾病的发生、发展密切相关^[2,10]。Sudol 等^[13]于 1995 年首先报道了 YAP1 蛋白, 人类 YAP1 基因位于 11q13 染色体, YAP1 蛋白的相对分子质量约 65 000, 作为 Hippo 信号通路下游重要的转录因子, 其在正常机体细胞内发挥信号转导和基因转录调节的作用。

本实验构建靶向 YAP1 基因的慢病毒干扰载体, 感染肺癌细胞株 A549 和工具细胞 293T, 72 h 后荧光显微镜显示沉默效率大于 80%, 说明构建的慢病毒干扰载体 si-YAP1 可有效沉默 YAP1 表达, 可用于下一步实验。qPCR 及蛋白质印迹法结果都证明 A549 细胞感染 YAP1 慢病毒干扰载体后, YAP1 的 mRNA 和蛋白表达均下调, 而无关病毒载体对 YAP1 的 mRNA 和蛋白表达没有明显影响, 说明靶向 YAP1 的小干扰 RNA 可高效沉默 A549 细胞 YAP1 基因及蛋白的表达。

2.4 沉默 YAP1 对 A549 细胞侵袭及迁移能力的影响 Transwell 实验结果(图 3)示, si-NC 组每个 100 倍视野穿过不含 Matrigel 滤膜的平均细胞数为 228 ± 13 , 高于 si-YAP1 组 (78 ± 14 , $P < 0.01$)。同样, si-NC 组每个 100 倍视野穿过含 Matrigel 滤膜的平均细胞数为 178 ± 11 , 高于 si-YAP1 组 (68 ± 12 , $P < 0.01$)。说明 YAP1 基因沉默后 A549 细胞的迁移和侵袭能力受到抑制。

细胞过度增殖、细胞周期失控是肿瘤发生的重要生物学基础。Tschaharganeh 等^[14]的研究发现在人肝癌细胞和鼠肝细胞中 Notch 信号通路配体 Jagged-1 (Jag-1) 表达增加, 激活 Notch 信号通路, 进而调控肝癌细胞增殖、迁移及侵袭。进一步研究发现, 这一过程需 YAP1 与其转录伴侣 TEAD4 结合, Mst1/2 而不是 β -catenin 的存在保证了 TEAD4 的结合。本实验结果显示, 与阴性对照相比, YAP1 基因沉默后, A549 细胞增殖能力降低。细胞增殖是通过细胞周期的运行来实现的, 若细胞的正常周期阻滞功能失调, 则导致细胞增殖失控, 最终形成肿瘤。流式细胞实验结果发现, YAP1 基因沉默后 A549 细胞周期的分布发生变化, S 期的细胞比例减少, G₀/G₁ 期细胞比例增加, 凋亡细胞增加。以上结果提示, YAP1 基因促进细胞增殖可能和细胞周期改变有关, 具体机制是否与细胞周期蛋白的激活调控有关尚需进一步研究。

肿瘤的侵袭和转移是一系列多因素、多信号通路相互作用的结果。研究表明, 过表达 YAP1 基因能促进癌细胞上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[15], EMT 与恶性肿

瘤细胞侵袭转移能力及临床预后密切相关^[16]。例如,Shao等^[15]发现,在肺癌中 YAP1 与 KRAS 共同作用活化转化因子 FOS,从而可能通过激活 EMT 相关的信号通路促进小鼠肺癌复发、侵袭及转移。

本研究表明慢病毒载体介导的小干扰 RNA 可有效抑制人 NSCLC 细胞株 A549 中 YAP1 mRNA 和蛋白的表达,从而抑制细胞增殖、侵袭。进一步研究 YAP1 在肿瘤侵袭、转移中的调节机制将有助于发现新的抗肿瘤靶点。

[参考文献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, WARD E. Cancer statistics, 2010[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60: 277-300.
- [2] KODAKA M, HATA Y. The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 285-306.
- [3] YEUNG B, YU J, YANG X. Roles of the Hippo pathway in lung development and tumorigenesis [J]. *Int J Cancer*, 2016, 138: 533-539.
- [4] ZANCONATO F, CORDENONSI M, PICCOLO S. YAP/TAZ at the roots of cancer [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29: 783-803.
- [5] XU M Z, YAO T J, LEE N P, NG I O, CHAN Y T, ZENDER L, et al. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2009, 115: 4576-4585.
- [6] LI M, LU J, ZHANG F, LI H, ZHANG B, WU X, et al. Yes-associated protein 1 (YAP1) promotes human gallbladder tumor growth via activation of the AXL/MAPK pathway [J]. *Cancer Lett*, 2014, 355: 201-209.
- [7] YU S J, HU J Y, KUANG X Y, LUO J M, HOU Y F, DI G H, et al. MicroRNA-200a promotes anoikis resistance and metastasis by targeting YAP1 in human breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 1389-1399.
- [8] NISHIKAWA E, OSADA H, OKAZAKI Y, ARIMA C, TOMIDA S, TATEMATSU Y, et al. miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage-dependent manner in lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 6165-6173.
- [9] KAPOOR A, YAO W, YING H, HUA S, LIEWEN A, WANG Q, et al. Yap1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer [J]. *Cell*, 2014, 158: 185-197.
- [10] SONG S, AJANI J A, HONJO S, MARU D M, CHEN Q, SCOTT A W, et al. Hippo coactivator YAP1 upregulates SOX9 and endows esophageal cancer cells with stem-like properties [J]. *Cancer Res*, 2014, 74: 4170-4182.
- [11] MURAMATSU T, IMOTO I, MATSUI T, KOZAKI K, HARUKI S, SUDOL M, et al. YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32: 389-398.
- [12] 胡光辉,徐亮,赖鹏,郭锥锋,刘欢,刘敏,等. RNA 干扰 YAP 基因对人膀胱癌 T24 细胞株增殖和迁移能力的影响 [J]. *中国癌症杂志*, 2014, 24: 406-411.
- [13] SUDOL M, BORK P, EINBONG A, KASTURY K, DRUCK T, NEGRINI M, et al. Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 14733-14741.
- [14] TSCHAHARGANEH D F, CHEN X, LATZKO P, MALZ M, GAIDA M M, FELIX K, et al. Yes-associated protein up-regulates Jagged-1 and activates the Notch pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2013, 144: 1530-1542.
- [15] SHAO D D, XUE W, KRALL E B, BHUTKAR A, PICCIONI F, WANG X, et al. KRAS and YAP1 converge to regulate EMT and tumor survival [J]. *Cell*, 2014, 158: 171-184.
- [16] YAMADA S, FUCHS B C, FUJII T, SHIMOYAMA Y, SUGIMOTO H, NOMOTO S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts prognosis of pancreatic cancer [J]. *Surgery*, 2013, 154: 946-954.

[本文编辑] 杨亚红