

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.12.022

YAP 在人甲状腺乳头状癌中的表达及对细胞生长的影响

章杰,林义,林雅

(浙江省温岭市第一人民医院病理科 317500)

[摘要] **目的** 探讨 Yes 相关蛋白(YAP)在人甲状腺乳头状癌中的表达及对甲状腺乳头状癌细胞生长的影响。**方法** 收集 57 例该院普通外科行手术切除的甲状腺乳头状癌及对应癌旁组织标本,所有患者均经病理诊断确认,免疫组织化学染色检测甲状腺乳头状癌及癌旁组织中的 YAP 表达,统计分析 YAP 蛋白与肿瘤临床病理资料间的相关性。siRNA 沉默甲状腺乳头状癌 B-CPAP 细胞中 YAP 基因表达,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)及流式细胞技术检测沉默 YAP 后 B-CPAP 细胞增殖及凋亡水平变化。**结果** YAP 蛋白在甲状腺乳头状癌组织中表达水平显著高于对应癌旁组织($P<0.05$);且 YAP 蛋白表达与 TNM 分期和肿瘤体积呈显著正相关($P<0.05$),沉默 YAP 基因可显著降低 B-CPAP 细胞的增殖能力,并促使细胞发生凋亡($P<0.05$)。**结论** YAP 在甲状腺乳头状癌组织中高表达并与肿瘤不良临床病理特征有关,下调 YAP 基因可显著抑制甲状腺乳头状癌细胞生长。

[关键词] Yes 相关蛋白;癌,乳头状;甲状腺肿瘤;基因表达;细胞增殖**[中图分类号]** R736.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)12-1653-03

Expression of YAP in human papillary thyroid cancer and its influence on cell growth

Zhang Jie, Lin Yi, Lin Ya

(Department of Pathology, First People's Hospital of Wenling city, Wenling, Zhejiang 317500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of Yes-associated protein(YAP) in human papillary thyroid cancer and its influence on cell growth. **Methods** The samples in 57 cases of papillary thyroid cancer treated by operation resection in the general surgery department of this hospital and the matched tumor-adjacent tissues were collected. All the cases were definitely diagnosed by the pathology examination. The expression of YAP protein in the cancer tissue and corresponding tumor-adjacent tissue were determined by the immunohistochemistry(IHC)staining. The relationship between the YAP protein and the clinicopathological data was statistically analyzed. siRNA was used to silence the expression of YAP in B-CPAP cells, MTT and flow cytometry were used to measure the proliferation and apoptosis changes. **Results** The expression level of YAP was markedly higher in papillary thyroid cancer tissues than in tumor adjacent tissues ($P<0.05$); moreover the expression of YAP protein was positively correlated with the tumor size and TNM stage ($P<0.05$). Silencing YAP gene could significantly inhibit the cell proliferation ability and promote cell apoptosis($P<0.05$). **Conclusion** YAP is highly expressed in papillary thyroid cancer tissues and is related with its adverse clinicopathological characteristics, down-regulating YAP gene can significantly inhibit the cell growth.

[Key words] Yes-associated protein; carcinoma, papillary; thyroid neoplasms; gene expression; cell proliferation

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤之一,其中甲状腺乳头状癌是其主要病理类型^[1],甲状腺癌早期症状隐匿、诊断困难、易发生转移,极大地危害广大人民群众的身心健康^[2]。近年来大规模的流行病学研究显示^[3],约半数以上的患者在确诊一年内死亡,而仅有 5% 的患者生存期超过 5 年。因此,对于甲状腺癌发生发展的分子生物学研究,对改善我国未来甲状腺癌的诊治水平具有重要意义。

Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)定位于人类染色体 11q13.1 上^[4],作为一个转录调控因子,在细胞内能够调节包括 SMAD(mothers against decapentaplegic protein)家族成员^[5]和转录增强区域(transcriptional enhancer domain, TEAD)转录因子家族成员^[6]等多个转录因子的活性。近年研究发现,YAP 对细胞增殖具有异常的促进作用,因而将 YAP 定义为一种重要的促癌基因,其生物学效应亦在许多人类恶性肿瘤中得到验证^[7]。目前,YAP 在甲状腺乳头状癌中的表达及对癌症细胞生长的调节作用尚不完全清楚。本研究通过免疫组织化学、基因转染及增殖凋亡检测等方法研究了 YAP 在甲状腺乳头状癌组织中的表达情况及沉默 YAP 对甲状腺乳

头状癌 B-CPAP 细胞增殖、凋亡的影响,旨在明确 YAP 基因在甲状腺乳头状癌诊断及治疗分子中的潜在临床及生物学意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 57 例于 2011 年 5 月至 2014 年 2 月间在本院普通外科行手术切除的甲状腺癌患者,所有患者均经病理证实为甲状腺乳头状癌的组织及对应癌旁组织标本。入组患者年龄 40~71 岁,平均(54.5±15.5)岁,其中男 37 例,女 20 例。标本于离体 30 min 内取材并于中性福尔马林溶液中保存。

1.2 主要试剂 兔 SP 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物科技有限公司。Trizol 试剂及脂质体 2000(LipofectamineTM 2000)购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒及 real time PCR 试剂盒购自大连宝生生物工程有限公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Roche 公司;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 -actin 引物,正向 5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3';反向 5'-GCT GTC ACC TTC

ACC GTT CC-3', 由上海生工生物科技有限公司合成; YAP 特异性 siRNA(sc-38637)及兔抗人 YAP 多克隆抗体(sc-17140)均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.3 免疫组织化学 石蜡组织切片经脱蜡、水化后,按 SP 免疫组织化学试剂盒说明书要求进行免疫组织化学染色。兔抗人 YAP 一抗工作浓度为 1:100,二抗采用生物素标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体,DAB 显色、苏木素复染,常规脱水、透明、中性树脂封片。高倍镜($\times 400$)下随机选取 10 个组织视野,按文献所述方法^[8]进行阅片、评分,取 10 个视野的平均得分作为切片的最终评分。

1.4 细胞培养 甲状腺乳头状癌细胞 B-CPAP 由本实验室保存。采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在适宜条件下进行培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.5 细胞转染 B-CPAP 细胞接种于 6 孔板中,参照 LipofectamineTM 2000 转染试剂说明书分别向 B-CPAP 细胞中转入阴性对照 siRNA(阴性对照组)和 YAP 特异性 siRNA(YAP siRNA 组),转染结束后采用 qRT-PCR 法检测 YAP mRNA 表达以确证转染效果。

1.6 qRT-PCR 按 RNA 提取试剂说明书方法提取细胞中的总 RNA,按逆转录及 PCR 扩增试剂盒说明书进行反应。以 β -actin 基因为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 YAP mRNA 相对表达量。

1.7 MTT 检测 分别收集转染 0、24、48、72 h 后的 B-CPAP 细胞,接种于 96 孔板内进行 MTT 检测,于酶标仪上 490 nm 测定各孔的吸光度(A)值。

1.8 流式细胞技术检测 取转染 72 h 后的 B-CPAP 细胞,按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明,通过流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

1.9 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 student-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲状腺乳头状癌及对应癌旁组织中 YAP 蛋白的表达情况 通过免疫组织化学方法检测 57 例甲状腺乳头状癌及对应癌旁组织中 YAP 的表达情况。甲状腺乳头状癌组织中 YAP 阳性表达率为 75.44%(43/57),而癌旁组织中 YAP 阳性表达率仅为 33.33%(19/57),两者间表达差异有统计学意义($\chi^2 = 20.367, P < 0.01$)。见图 1。

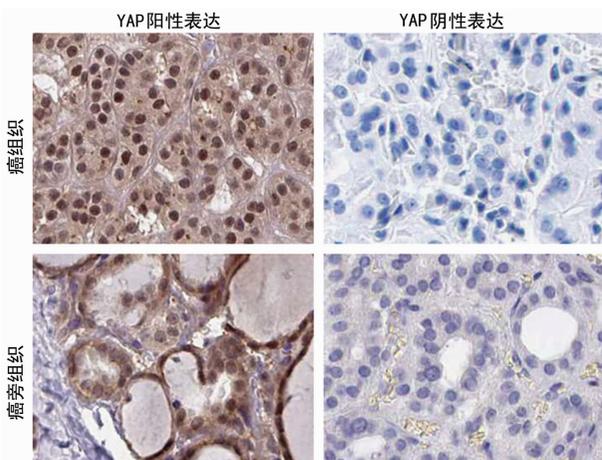


图 1 YAP 蛋白在甲状腺乳头状癌及对应癌旁组织中的表达(免疫组织化学 $\times 400$)

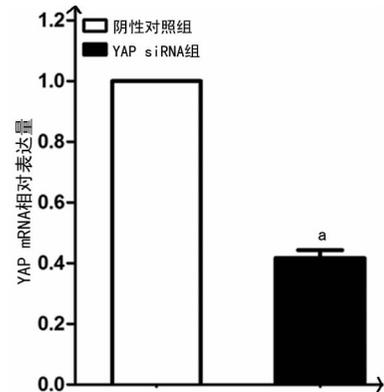
2.2 YAP 表达与甲状腺乳头状癌临床病理特征间的相关性分析 癌组织中 YAP 蛋白的表达与甲状腺乳头状癌肿瘤体积及 TNM 分期呈正相关($P < 0.05$),提示肿瘤中 YAP 蛋白阳性表达的患者可能预后不良。见表 1。

表 1 YAP 表达与甲状腺乳头状癌患者临床病理特征的关系[n]

项目	组别	YAP 阴性 (n=14)	YAP 阳性 (n=43)	χ^2	P
年龄	<50 岁	7	18	0.284	0.785
	≥ 50 岁	7	25		
性别	男	10	27	0.071	0.749
	女	4	16		
肿瘤体积	<2 cm	9	12	6.007	0.024
	≥ 2 cm	5	31		
肿瘤数量	1 个	8	12	3.963	0.059
	≥ 2 个	6	31		
组织学分级	G ₁ ~G ₂	7	24	0.144	0.764
	G ₃	7	19		
淋巴结转移	无	9	20	1.335	0.358
	有	5	23		
TNM 分期	I~II	10	16	4.985	0.034
	III~IV	4	27		

χ^2 、P 为各项目中不同分组 YAP 阳性率比较所得。

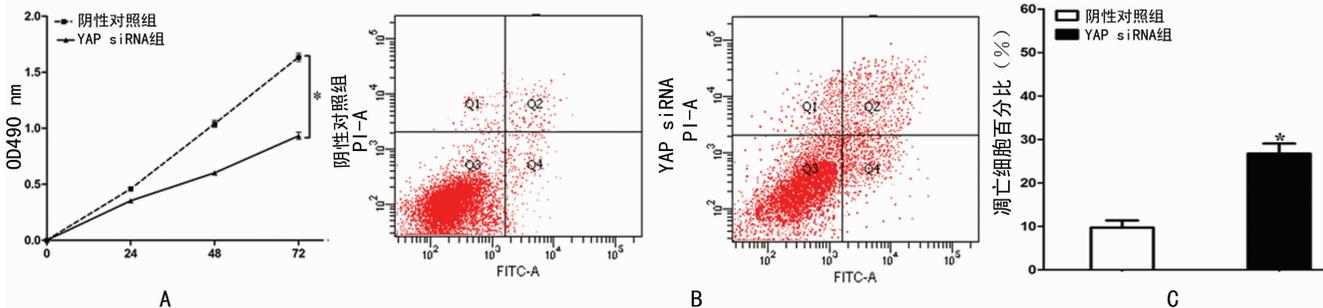
2.3 siRNA 下调甲状腺乳头状癌 B-CPAP 细胞中 YAP 的表达 在 B-CPAP 细胞中瞬时转染入 YAP 特异性 siRNA 及阴性对照 siRNA,qRT-PCR 法检测得,与阴性对照组比较,YAP siRNA 组 B-CPAP 细胞中 YAP mRNA 的表达水平显著下调($P < 0.05$),见图 2。



*: $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

图 2 siRNA 下调 B-CPAP 细胞中 YAP 的表达水平

2.4 下调 YAP 的表达能抑制 B-CPAP 细胞的增殖并促进其凋亡 于转染 0、24、48、72 h 后,采用 MTT 检测细胞增殖能力的变化;结果显示,与阴性对照组比较,YAP siRNA 组 B-CPAP 细胞增殖能力降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3A。为进一步验证沉默 YAP 对细胞增殖的影响,作者使用 siRNA 转染 B-CPAP 细胞 72 h 后,采用流式细胞技术检测细胞凋亡变化;与阴性对照组比较,YAP siRNA 组可明显增加 B-CPAP 细胞的细胞比例($P < 0.05$)见图 3B、C。



A: 增殖曲线图; B: 阴性对照 siRNA、YAP siRNA 细胞凋亡图; C: 凋亡分析图。

图 3 沉默 YAP 对 B-CPAP 细胞增殖、凋亡的影响

3 讨论

甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤之一。目前,甲状腺癌治疗的主要方法是根治性手术及术后规范放、化疗^[9],但甲状腺癌早期症状不明显,诊断困难,且易发生淋巴转移,因此多数患者就诊时已失去根治性手术机会,对放化疗敏感程度的个体差异性也是导致术后早期复发、转移的主要原因。近年来,利妥昔单抗^[10]及贝伐单抗^[11]等分子靶向治疗药物在甲状腺癌的治疗中显现出一定优势,有关甲状腺癌的分子生物学诊断和生物靶向治疗的研究能给甲状腺癌的早期诊治提供参考依据,具有重要的意义。

近年来,许多学者都进行了 YAP 与肿瘤的相关性研究。在乳腺癌^[12]中,YAP 在 mRNA 及蛋白水平均呈现异常高表达,并与患者不良预后显著相关。除此之外,YAP 基因和经典癌基因 KRAS 一同促进细胞发生上皮细胞间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)改变,从而增加肿瘤的恶性生物学表型^[13]。Tu 等^[14]研究发现,肝癌组织中 YAP 基因表达与肿瘤恶性临床表型及术后较短的生存期呈正相关,利用 siRNA 在沉默肝癌细胞中 YAP 的表达可显著抑制肝癌细胞的增殖能力并促进其凋亡。

本研究证实,YAP 在甲状腺乳头状癌中呈明显高表达趋势,且与甲状腺乳头状癌的肿瘤体积增大及高 TNM 分期显著相关,提示 YAP 可能在甲状腺乳头状癌生长、转移过程中发挥重要作用。为进一步探究 YAP 是否能对甲状腺乳头状癌细胞生长产生调节效应,作者通过特异性 siRNA 沉默了 B-CPAP 细胞中 YAP 基因的表达,通过 MTT 及流式细胞术检测发现,下调 YAP 基因的表达水平不仅能阻碍 B-CPAP 细胞的增殖能力而且可以促进细胞凋亡的发生,这一效应可能与沉默 YAP 后,其所调控的下游包括 survivin、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)和 cyclin D1 在内^[15]的多种促生长转录因子形成减少有关。

综上所述,YAP 在甲状腺乳头状癌中呈现异常的高表达趋势,而且其异常高表达与甲状腺乳头状癌不良临床及病理特征相关。YAP 有可能是甲状腺乳头状癌发生发展过程中的重要调节因子。

参考文献

[1] 孙诚谊,朱海涛. 甲状腺乳头状癌的外科综合治疗[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(2): 159-163.
 [2] 于琦,赵平,王成锋. 甲状腺乳头状癌预后相关因素分析[J]. 中国临床医生, 2014, 42(3): 23-26.
 [3] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
 [4] Felley-Bosco E, Stahel R. Hippo/YAP pathway for targeted therapy[J]. Transl Lung Cancer Res, 2014, 3(2): 75-83.

[5] Narimatsu M, Samavarchi-Tehrani P, Varelas X, et al. Distinct polarity cues direct Taz/Yap and TGFβ receptor localization to differentially control TGFβ-induced Smad signaling[J]. Dev Cell, 2015, 32(5): 652-656.
 [6] Cebola I, Rodríguez-Seguí SA, Cho CH, et al. TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(5): 615-626.
 [7] Tan G, Cao X, Dai Q, et al. A novel role for microRNA-129-5p in inhibiting ovarian cancer cell proliferation and survival via direct suppression of transcriptional co-activators YAP and TAZ[J]. Oncotarget, 2015, 6(11): 8676-8686.
 [8] 孙颖,田云霄,王双海,等. C-met 和 COX-2 在甲状腺乳头状癌中的表达及其相关性研究[J]. 实用肿瘤学杂志, 2014, 28(5): 396-400.
 [9] 田碧. 甲状腺乳头状癌的治疗现状[J]. 肿瘤基础与临床, 2014, 27(1): 86-89.
 [10] Hoffmann S, Burchert A, Wunderlich A, et al. Differential effects of cetuximab and AEE 788 on epidermal growth factor receptor (EGF-R) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) in thyroid cancer cell lines[J]. Endocrine, 2007, 31(2): 105-113.
 [11] Libertini S, Iacuzzo I, Perruolo G, et al. Bevacizumab increases viral distribution in human anaplastic thyroid carcinoma xenografts and enhances the effects of E1A-defective adenovirus dl922-947[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(20): 6505-6514.
 [12] Rashidian J, Le Scolan E, Ji X, et al. Ski regulates Hippo and TAZ signaling to suppress breast cancer progression [J]. Sci Signal, 2015, 8(363): ra14.
 [13] Shao DD, Xue W, Krall EB, et al. KRAS and YAP1 converge to regulate EMT and tumor survival[J]. Cell, 2014, 158(1): 171-184.
 [14] Tu K, Yang W, Li C, et al. Fbxw7 is an Independent prognostic marker and induces apoptosis and growth arrest by regulating YAP abundance in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer, 2014, 13: 110.
 [15] Huang JM, Nagatomo I, Suzuki E, et al. YAP modifies cancer cell sensitivity to EGFR and survivin inhibitors and is negatively regulated by the non-receptor type protein tyrosine phosphatase 14 [J]. Oncogene, 2013, 32(17): 2220-2229.