

# 干扰YAP1对食管癌Eca-109细胞生物学功能的影响

宋杰<sup>1</sup> 吴庆琛<sup>1\*</sup> 张诚<sup>1</sup> 王德林<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016; <sup>2</sup>重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

**摘要** 该文研究Yes相关蛋白1(Yes-associated protein 1, YAP1)对Eca-109细胞生物学功能的影响。构建针对YAP1基因的shRNA慢病毒载体, 转染Eca-109细胞, 采用qPCR和蛋白印迹法检测转染前后Eca-109细胞中YAP1 mRNA和蛋白以及P53蛋白的表达情况; 流式细胞仪检测细胞周期、凋亡情况; CCK-8实验检测细胞的增殖情况变化。结果显示, 慢病毒转染组细胞内YAP1 mRNA和蛋白表达量低于空白对照组和空病毒转染组, p53基因表达量高于空白对照组和空病毒转染组; Eca-109细胞增值率从第3 d开始低于对照组( $P < 0.05$ ); 慢病毒转染组细胞G<sub>1</sub>期比例增高( $P < 0.05$ ), 早期凋亡率增加( $P < 0.05$ ), 以上差异均有统计学意义。结果表明, 干扰YAP1可诱导Eca-109细胞凋亡, 降低Eca-109细胞的增殖能力, 且其抗凋亡的作用可能部分与p53基因相关。

**关键词** Eca-109细胞; YAP1; RNAi; p53基因

## The Impact of Interfering YAP1 on the Biological Function of Eca-109 Cells

Song Jie<sup>1</sup>, Wu Qingchen<sup>1\*</sup>, Zhang Cheng<sup>1</sup>, Wang Delin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

<sup>2</sup>Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** To research the impact of interfering Yes-associated protein 1 (YAP1) on the biological function of Eca-109 cells, YAP1 shRNA was cloned into lentivirus vector. Then Eca-109 cell line was infected by the lentivirus vector. The mRNA level of YAP1 was detected by qPCR. The expressions of YAP1 and P53 in stable were analyzed by Western blot. The apoptosis of Eca-109 was estimated with FCM. And the cell proliferation of Eca-109 was analyzed by CCK-8 assay. The expression of YAP1 in transfected group was inhibited significantly, and the expression of p53 in transfected group was overexpressed significantly. The apoptosis of transfected group increased compared with the other groups. And the proliferation rate of transfected cells was lower than that of untransfected cells. The result demonstrated that interfering YAP1 could promote Eca-109 cells apoptosis and inhibit the cell proliferation, and its resistance to apoptosis might be partly related to the p53 gene.

**Keywords** Eca-109 cells; YAP1; RNAi; p53 gene

食管癌是人类常见恶性肿瘤, 是危害人类健康的严重疾病之一, 发病率和死亡率在世界范围内均较高。食管癌5年生存率在美国约为10%, 在欧洲约为16%<sup>[1]</sup>。我国是世界上食管癌的高发区, 发病率和死亡率均居世界之首, 死亡人数占全国恶性肿瘤死

亡人数的22%, 仅次于胃癌, 居第二位<sup>[2]</sup>。近年来, 随着外科手术的发展, 食管癌5年生存率有所提高, 但仍是危害人类的十大肿瘤之一。目前认为, 食管癌的发病是集性别、年龄、遗传、生活习惯、环境、化学及生物等多因素为一体的复杂过程, 其确切的机制尚不清楚。

HIPPO信号转导通路最初发现于果蝇体内, 其在调节器官大小和发育中有着重要作用<sup>[3]</sup>。研究表明, HIPPO通路在各种生物体内高度保守, 与人类多种肿瘤(如乳腺癌、肺癌、前列腺癌和结肠癌等)的发生、发展有着密切的联系<sup>[4-5]</sup>。YAP作为HIPPO通

收稿日期: 2014-11-26 接受日期: 2015-02-26

重庆市科委科研项目(批准号: CSTC2008BB5215)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-89011132, E-mail: wuqc6@hotmail.com

Received: November 26, 2014 Accepted: February 26, 2015

This work was supported by Science and Technology Commission of Chongqing Project (Grant No. CSTC2008BB5215)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-89011132, E-mail: wuqc6@hotmail.com

网络出版时间: 2015-06-01 14:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150601.1448.005.html>

路中的一个重要元件,是一种原癌基因,可以影响细胞凋亡<sup>[6]</sup>。目前有关HIPPO通路在食管癌的研究在国内外均较少,本研究通过shRNA干扰食管癌Eca-109细胞中YAPI的表达,探究其对食管癌细胞生物学功能的调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

YAPI兔抗人单克隆抗体购自Abcam试剂公司; P53兔抗人多克隆抗体购自武汉三鹰公司; YAPI干扰慢病毒载体由上海吉凯基因化学技术有限公司构建(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科王德林教授课题组赠送); 1640细胞培养基、优质胎牛血清购自Hyclone公司; RNA提取试剂盒、RNA逆转录试剂盒购自TaKaRa公司; 蛋白提取BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒购自碧云天生物科技有限公司; 抗兔 $\beta$ -actin多克隆抗体购自北京康为世纪科技有限公司; Eca-109细胞为本科室冻存。

### 1.2 方法

**1.2.1 干扰YAPI慢病毒转染Eca-109细胞** 将Eca-109细胞分为三组: 转染组(YAPI干扰慢病毒转染Eca-109细胞)、空病毒转染组(空病毒转染Eca-109细胞)和空白对照组(未进行处理的Eca-109细胞)。在培养瓶中培养Eca-109细胞,待细胞状态良好、处于对数生长期时,以每孔 $1 \times 10^5$ 的细胞数接种于6孔板,加培养液2 mL,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养8 h。弃去原培养液,加入1 mL新鲜培养液,病毒稀释后以MOI值40的病毒数量加入到6孔板中,混匀,继续培养12 h后弃去含病毒的培养液,加入1 mL新鲜培养液继续培养,常规换液,培养96 h。荧光显微镜下观察荧光表

达情况,转染效率大于90%视为转染成功,转至培养瓶继续培养。

**1.2.2 qPCR检测各组细胞YAPI mRNA表达情况** YAPI引物由上海生工生物工程有限公司构建,GAPDH为内参(表2)。取一定量的细胞用0.25%胰酶消化,离心收集细胞,加Trizol裂解提取总RNA, RNA浓度测定合格后,用逆转录试剂盒逆转录成cDNA,进行qPCR。扩增程序为: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40个循环,每个样品设置3个重复。

**1.2.3 Western blot检测YAPI和P53蛋白表达** 将转染组、空病毒转染组、空白对照组细胞进行消化离心后以预冷的PBS清洗细胞2次,转至EP管离心弃上清液,加入适量蛋白裂解液和1%体积的蛋白酶抑制剂,置于冰上裂解30 min,然后于4 °C、12 000 r/min离心15 min,得到总蛋白。BCA法测蛋白浓度,取50  $\mu$ g, 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至PVDF膜上,50 g/L脱脂牛奶封闭2 h后加入一定比例稀释的一抗,4 °C孵育过夜后TBST室温摇床洗膜5 min $\times$ 5,加入相应稀释的二抗,37 °C孵育1 h, TBST室温摇床洗膜5 min $\times$ 5,加入ECL发光试剂后凝胶成像显影。以 $\beta$ -actin为内参,对条带用Quantity One软件进行统计分析。

**1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡** 培养细胞至铺板70%~80%,换无血清培养基培养24 h,换正常培养液培养24 h,消化、离心收集细胞,预冷PBS洗2次后加入预冷70%乙醇固定,4 °C固定过夜。离心弃去固定液后加入RNase和PI,避光染色30 min,流式细胞仪检测周期分布。实验重复3次。

消化离心收集各组细胞约 $1 \times 10^6$ , PBS洗2次加500  $\mu$ L Binding buffer重悬细胞,加入2  $\mu$ L Annexin V-FITC混匀,加入5  $\mu$ L碘化丙啶,混匀。避光、室温反应5 min,流式细胞仪检测凋亡率。实验重复3次。

表1 阴性对照序列及YAPI-shRNA序列

Table 1 Meaningless negative control sequence and YAPI-shRNA sequence

组别 group	序列(5'-STEMP-Loop-STEMP-3') Sequences (5'-STEMP-Loop-STEMP-3')
Negative sequence	Sense strand 5'-CCGGTTCTCCGAACGTGTCACGT-TTCAAGAGA-ACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTG-3'
	Antisense strand 5'-AATTCAAAAATCTCCGAACGTGTCACGT-TCTCTTGAA-ACGTGACACGTTCCGAGAA-3'
YAPI-shRNA sequence	Sense strand 5'-CCGGCCGTTTCCAGACTACCTT-CTCAAGAGA-AAGGTAGTCTGGGAAACGGTTTTTTG-3'
	Antisense strand 5'-AATTCAAAAACCGTTTTCCAGACTACCTT-TCTCTTGAG-AAGGTAGTCTGGGAAACGG-3'

表2 qPCR引物  
Table 2 Primer pairs for qPCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	产物大小 Product size
YAP1	F: CAG TGG ACT AAG CAT GAG CA	141 bp
	R: TCA AGG TAG TCT GGG AAA CG	
GAPDH	F: CAG GAG GCA TTG CTG ATG AT	138 bp
	R: GAA GGC TGG GGC TCA TTT	

1.2.5 CCK-8法检测细胞增殖能力 将对数生长期的Eca-109细胞按1 000/孔的量接种于96孔板中,分三组(空白对照组、空病毒转染组、转染组),每组设3个复孔,每孔加100  $\mu$ L培养液,置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养24 h。分别进行空病毒和慢病毒转染操作,转染24 h后开始检测,在固定时间向待测孔加入10  $\mu$ L CCK-8溶液,37  $^{\circ}$ C避光反应1 h后用酶标仪测定吸光度(D)值。实验重复3次。

1.2.6 统计学分析 采用SPSS 20.0软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组均数比较采用*t*检验;多组间单因素分析采用One-Way ANOVA检验;*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 慢病毒转染获得稳定干扰YAP1的Eca-109细胞株 转染操作96 h后于荧光显微镜下观察荧光情况,

空载体组和转染组荧光均较强,经计算,转染效率均在90%以上,转入培养瓶中培养,得到稳定株(图1)。

### 2.2 qPCR检测转染前后YAP1 mRNA的表达情况

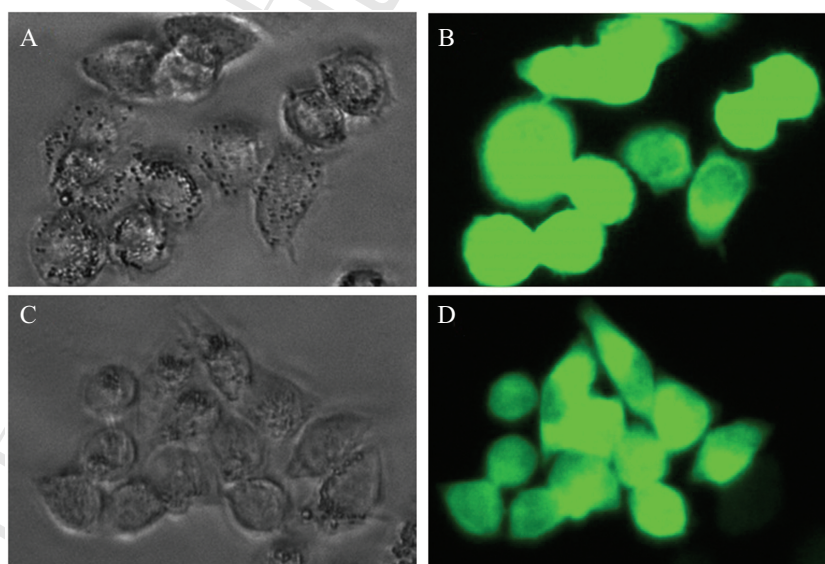
qPCR结果显示,转染组YAP1 mRNA表达量明显低于空白对照组和空病毒转染组(*P*<0.05);而空白对照组和空病毒转染组YAP1 mRNA表达量差异无统计学意义(*P*>0.05,图2和表3)。

### 2.3 Western blot检测各组细胞YAP1和P53蛋白的表达情况

Western blot结果显示,转染组YAP1蛋白表达量低于空白对照组和空病毒转染组(*P*<0.05);转染组P53蛋白表达量高于空白对照组和空病毒转染组(*P*<0.05);而空白对照组和空病毒转染组YAP1以及P53蛋白表达量差异无统计学意义(*P*>0.05,表3和图3)。

### 2.4 干扰YAP1基因对Eca-109细胞增殖的影响

CCK-8实验结果显示,在转染前2 d,转染组、空



A: 光镜下的空病毒转染组; B: 荧光显微镜下的空病毒转染组; C: 光镜下的转染组; D: 荧光显微镜下的转染组。

A: the empty vector transfected group under optical microscope; B: the empty vector transfected group under fluorescence microscope; C: the transfected group under optical microscope; D: the transfected group under fluorescence microscope.

图1 Eca-109细胞慢病毒转染的结果(400 $\times$ )

Fig.1 Lentiviral vector transfection into Eca-109 cells (400 $\times$ )

表3 转染前后三组细胞间YAP1和P53 mRNA和蛋白质水平的比较( $\bar{x}\pm s$ )Table 3 The expressions of mRNA and protein level of YAP1 and P53 in the three groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别 Group	转染组 Transfected group	空病毒转染组 Empty vector transfected group	空白对照组 Untransfected group
YAP1 mRNA	0.204 1±0.098 8*	1.083 3±0.280 2	0.987 3±0.055 4
YAP1 protein	0.131 7±0.017 8*	0.293 9±0.038 1	0.320 9±0.031 4
P53 protein	0.462 4±0.042 0*	0.265 3±0.028 8	0.302 9±0.095 1

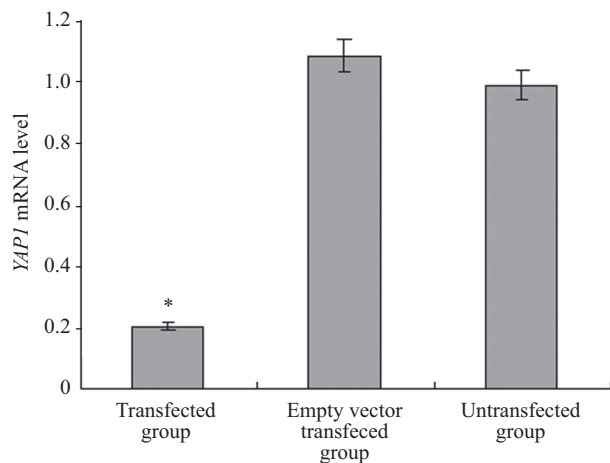
\* $P<0.05$ , 与其他两组比较。\* $P<0.05$  vs the other two groups.\* $P<0.05$ , 与其他两组相比较。\* $P<0.05$  vs the other two groups.

图2 三组细胞YAP1 mRNA表达情况

Fig.2 The expression levels of YAP1 mRNA in the three groups

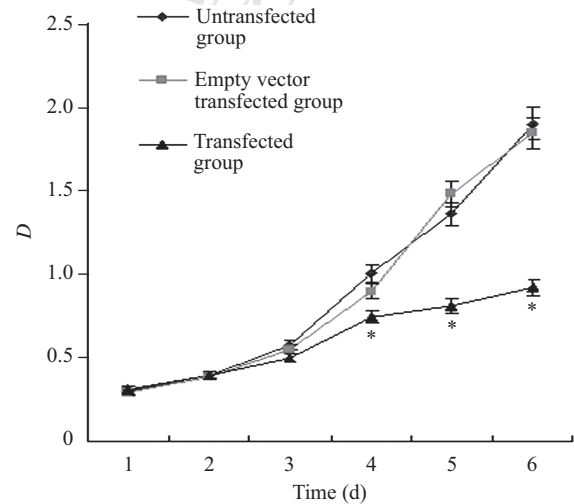
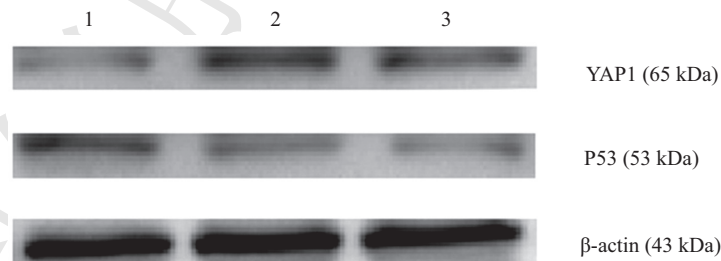
\* $P<0.05$ , 与其他两组相比较。\* $P<0.05$  vs the other two groups.

图4 干扰YAP1对Eca-109细胞增殖的影响

Fig.4 Impact of interfering YAP1 on cell proliferation of Eca-109 cells



1: 转染组; 2: 空病毒转染组; 3: 空白对照组。

1: transfected group; 2: empty vector transfected group; 3: untransfected group.

图3 YAP1、P53蛋白在三组细胞中的表达情况

Fig.3 The expressions of YAP1 and P53 protein in the three group cells

病毒转染组和空白对照组在每个时间点的D值无明显差异( $P>0.05$ ); 转染后第4 d开始, 转染组D值低于空白对照组和空病毒转染组( $P<0.05$ ), 而空病毒转染组和空白对照组之间的D值仍无明显差异( $P>0.05$ , 图4)。

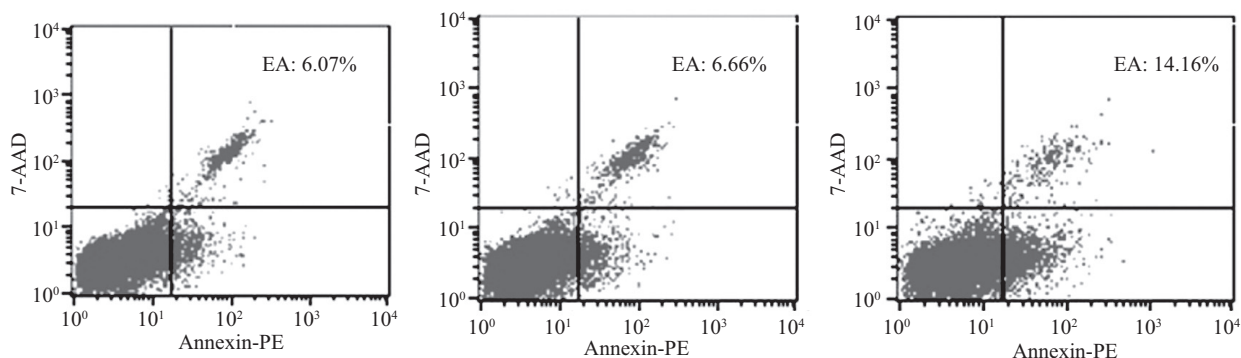
## 2.5 干扰YAP1基因对Eca-109细胞凋亡的影响

流式细胞仪对三组细胞进行检测, 结果显示,

转染组早期凋亡率分别高于空白对照组和空病毒转染组( $P<0.05$ ), 差异有统计学意义, 而空白对照组和空病毒转染组早期凋亡率无明显差异( $P>0.05$ , 图5和表4)。

## 2.6 干扰YAP1基因对Eca-109细胞细胞周期的影响

流式细胞仪对三组细胞进行细胞周期检测。结



A: 空白对照组; B: 空病毒转染组; C: 转染组。

A: untransfected group; B: empty vector transfected group; C: transfected group.

图5 干扰YAP1对Eca-109细胞凋亡的影响

Fig.5 Impact of interfering YAP1 on cell apoptosis of Eca-109 cells

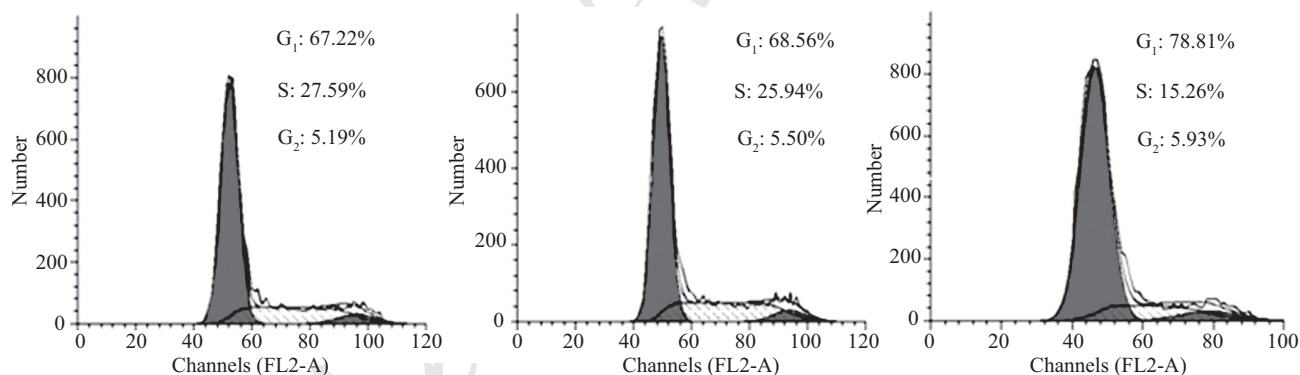
表4 YAP1基因对Eca-109细胞周期及凋亡的影响(% , n=3,  $\bar{x}\pm s$ )

Table 4 Effect of YAP1 on the cell cycle and apoptosis of Eca-109 cells (% , n=3,  $\bar{x}\pm s$ )

组别 Group	细胞周期 Cell cycle			早期凋亡 Early apoptosis
	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>	
Untransfected group	66.5±1.3	29.3±2.0	4.2±0.9	6.1±0.3
Empty vector transfected group	68.5±1.5	27.6±2.6	4.3±1.1	6.5±0.5
Transfected group	79.4±2.9*	15.5±2.4*	5.1±0.9	14.1±1.2*

\* $P<0.05$ , 与其他两组相比较。

\* $P<0.05$  vs the other two groups.



A: 空白对照组; B: 空病毒转染组; C: 转染组。

A: untransfected group; B: empty vector transfected group; C: transfected group.

图6 干扰YAP1对Eca-109细胞周期的影响

Fig.6 Impact of interfering YAP1 on cell cycle of Eca-109 cells

果显示, 转染组G<sub>1</sub>期细胞比例高于空白对照组和空病毒转染组( $P<0.05$ ), S期细胞比例低于空白对照组和空病毒转染组( $P<0.05$ ), 三组细胞间G<sub>2</sub>期细胞比例均无差异( $P>0.05$ , 图6和表4)。

### 3 讨论

我国是食管癌高发区, 其发病率和病死率均居世界之首。HIPPO通路对哺乳动物细胞的增殖和凋

亡有重要的调节作用。YAP作为HIPPO通路中的重要元件, 研究证明, YAP在多种肿瘤中高表达, 如乳腺癌、肺癌和前列腺癌<sup>[7-9]</sup>。目前认为, YAP为原癌基因, 其磷酸化可促进细胞凋亡, 其去磷酸化可促使其进入细胞核与核内TEAD结合, 促进细胞增殖<sup>[10-11]</sup>。然而, Aylon等<sup>[12]</sup>发现, YAP可通过ASSP1影响p53基因, 从而影响细胞凋亡。自1998年Fire等<sup>[13]</sup>首次发现RNA干扰现象以来, RNA干扰成为研究基因的重要

手段之一。近来, Xue等<sup>[14]</sup>学者通过RNAi技术干扰食管癌Eca-109细胞HAT1(histone acetyltransferase 1)基因,发现HAT1对于食管癌Eca-109细胞增殖具有重要作用。目前关于YAP在食管癌中的作用,国内外相关报道均较少。

诱导肿瘤细胞凋亡一直是肿瘤治疗的重要研究方向。本研究利用慢病毒转染食管癌Eca-109细胞,使用qPCR和蛋白印迹法验证YAPI基因的表达被成功抑制。后期本研究通过qPCR、蛋白印迹、CCK-8实验、流式细胞仪测周期和凋亡等多种方法验证了干扰YAPI具有抑制Eca-109细胞增殖、促进其凋亡的作用。同时,通过转染前后Eca-109细胞内p53基因的表达量分析,证实YAPI不仅仅作为HIPPO通路的重要组成元件,同时也可以通过p53基因途径诱导细胞进入经典凋亡通路,促进食管癌Eca-109细胞凋亡。这些为食管癌的基因靶向治疗奠定了一定的基础。

YAPI在食管癌的发生、发展中可能起着重要作用。虽然通过我们以上的研究证实了部分机制,然而关于YAPI与细胞凋亡发生的机制以及YAPI与其他通路之间的关系可能仍非常复杂,这有待于进一步研究。全面深入地研究YAPI的作用机制可能为食管癌的早期诊断和治疗提供新的策略和靶点。

### 参考文献 (References)

- Siersema PD, Vleggar FP. Esophageal strictures, tumors, and fistulae; Alternative techniques for palliating primary esophageal cancer. *Tech Gastrointest Endosc* 2010; 12(4): 203-9.
- 邹小农. 食管癌流行病学. *中华肿瘤防治杂志(Zou Xiaonong. Esophageal cancer epidemiology. Chin J Cancer Prev Treat)* 2006; 13(18): 1-4.
- Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: Growth control and beyond. *Development* 2011; 138(1): 9-22.
- Visser S, Yang X. LATS tumor suppressor: A new governor of cellular homeostasis. *Cell Cycle* 2010; 9(19): 3892-903.
- Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, Dong J, Maitra A, Pan D, et al. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum Pathol* 2008; 39(11): 1582-9.
- Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP. *Cell* 2005; 122(3): 421-34.
- Zhi X, Zhao D, Zhou Z, Liu R, Chen C. YAP promotes breast cell proliferation and survival partially through stabilizing the KLF5 transcription factor. *Am J Pathol* 2012; 180(6): 2452-61.
- Wang Y, Dong Q, Zhang Q, Li Z, Wang E, Qiu X. Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis non-small-cell lung cancer. *Cancer* 2010; 101(5): 1279-85.
- Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes* 2007; 21(21): 2747-61.
- Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, et al. TEAD mediated YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes* 2008; 22(14): 1962-71.
- Zhang H, Liu CY, Zha ZY, Zhao B, Yao J, Zhao S, et al. TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2009; 284(20): 13355-62.
- Aylon Y, Ofir-Rosenfeld Y, Yabuta N, Lapi E, Nojima H, Lu X, et al. The Lats2 tumor suppressor augments P53-mediated apoptosis by promoting the nuclear proapoptotic function of ASSP1. *Gene* 2010; 24(21): 2420-9.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806-11.
- Xue L, Hou J, Wang Q, Yao L, Xu S, Ge D. RNAi screening identifies HAT1 as a potential drug target in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(7): 3898-907.