

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.009

YAP 基因及蛋白在肾癌中的表达及意义

李兴森¹, 黄 飏¹, 王德林², 唐 伟²

(1. 重庆市綦江区人民医院泌尿外科, 重庆 401420; 2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘 要】目的: 观察 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)基因及蛋白在肾癌组织中的表达情况及其意义。方法: 采用 RT-PCR 技术及免疫组化检测 42 例肾癌组织和癌旁正常肾组织中 YAP 基因及蛋白的表达情况。结果: YAP 基因在肾癌组织中阳性表达率为 88.10%, 而在癌旁正常组织中仅为 14.29%。YAP 蛋白在肾癌组织中阳性率也高于癌旁正常组织(95.23% vs. 30.95%), 两者相比有统计学差异($P < 0.05$)。结论: YAP 可能与肾癌的发生发展密切相关, YAP 在肾癌中的异常表达可为肾癌的诊断、治疗提供实验依据, 尤其为诱导细胞凋亡和基因治疗肾癌打下基础。

【关键词】肾癌; Yes 相关蛋白; 逆转录聚合酶链反应; 免疫组化

【中国图书分类法分类号】R737

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-04-22

作者介绍: 李兴森(1963-), 男, 副主任医师,

研究方向: 泌尿肿瘤。

通信作者: 王德林, 男, 教授, Email: dlwang1968@sina.com。

AHS 的发生, 其机制可能是: ①下食管括约肌功能不全、食管廓清能力下降、食管内 pH 下降等均可反射性引起迷走神经兴奋, 导致气管收缩及呼吸抑制; ②食管内酸刺激引起气管高反应性或改变气管迷走神经张力。此外, 胃酸反流会引起喉炎和喉水肿, 这也会加重上呼吸道阻塞。因此, OSAHS 与 GERD 的关系, 目前仍有争议, 仍需要进一步探讨和研究。

参 考 文 献

- [1] Green B T, Broughton W A, O' Connor J B. Maked improvement in nocturnal gastroesophageal reflux in a large cohort of patients with obstructive sleep apnea treated with continous positive airway pressure[J]. Arch Intern Med, 2003, 163(1): 41-45.
- [2] 郭超花, 王 蓓. OSAHS 的可能发病机制、对人体的危害及诊疗新进展[D]. 太原: 山西医科大学, 2010.
- [3] Guo C H, Wang B. The pathogenesis, effect, diagnosis and treatment of the OSAHS[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2010.
- [4] 许 哲, 钟英强. 食管炎与细胞因子[J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(3): 139-142.
- [5] Xu Z, Zhong Y Q. Esophagitis and cytokines[J]. International Journal of Internal Medicine, 2007, 34(3): 139-142.
- [6] 王 璋, 司良毅, 廖友斌. 大鼠睡眠呼吸暂停综合征动物模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(1): 40-43.
- [7] Wang Z, Si L Y, Liao Y B. Establishment of sleep apnea syndrome model in rats[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2006, 14(1): 40-43.
- [8] 徐兆军, 张振玉, 黄文斌, 等. 胃食管反流病患者食管上皮 Oc-

cludin 的表达及细胞间隙的改变[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(27): 2835-2839.

Xu Z J, Zhang Z Y, Huang W B, et al. Expression of tight junction protein Occludin and changes in intercellular space in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(27): 2835-2839.

[6] 张敏艳, 刘卓拉, 张秀兰. 血清白介素-6, C-反应蛋白在阻塞性睡眠呼吸暂停通气综合征及其合并冠心病患者体内的水平变化[J]. 中国医药与临床, 2011, 11(1): 34-37.

Zhang M Y, Liu Z L, Zhang X L. Variation of serum interleukin-6 and C-reactive protein levels in obstructive sleep apnea hypoventilation syndrome with or without accompanying CAD[J]. Chinese Remedies & Clinics, 2011, 11(1): 34-37.

[7] Ryan S, Taylor C T, McNicholas W T. Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(7): 824-830.

[8] Meier-Ewert H K, Ridker P M, Rifai N, et al. Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(4): 678-683.

[9] Vgontzas A N, Zoumakis E, Bixler E O, et al. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(5): 2119-2126.

[10] 肖高辉, 王智凤, 柯美云, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与胃食管反流的关系及对抗反流治疗的效果[J]. 中华内科杂志, 1999, 38(1): 33-36.

Xiao G H, Wang Z F, Ke M Y, et al. The relationship between obstructive sleep apnea and gastroesophageal reflux and the effect of antireflux therapy[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 1999, 38(1): 33-36.

(责任编辑: 关蕴良)

Expression and clinical significance of YAP gene and protein in human renal carcinoma tissues

LI Xingsen¹, HUANG biao¹, WANG delin², TANG wei²

(1. Department of Urology Surgery, People's Hospital of Qijiang; 2. Department of Urology Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression and clinical significance of Yes-associated protein (YAP) gene and protein in human renal carcinoma tissues. **Methods:** The expressions of YAP mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the expressions of YAP protein were detected by immunohistochemistry in 42 human renal carcinoma tissues and their corresponding adjacent non-malignant tissues. **Results:** The positive expression rates of YAP mRNA in renal carcinoma tissues and adjacent non-malignant tissues were 88.10% and 14.29% respectively. The positive expression rate of YAP protein was higher in renal carcinoma tissues than in adjacent non-malignant tissues (95.23% vs. 30.95%), with statistical differences ($P < 0.05$). **Conclusions:** The expression of YAP might be associated with the generation and development of renal carcinoma and its abnormal expression can provide references for the diagnosis and treatment of renal carcinoma. Especially, it can establish the theoretical basis for inducement of cell apoptosis and gene therapy of renal carcinoma.

[Key words] renal carcinoma; Yes-associated protein; reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); immunohistochemistry

Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 是一种连接蛋白和转录共激活因子, 在正常机体细胞内发挥着信号转导和基因转录调节作用, 通过促进细胞凋亡和限制细胞增殖, 从而调控器官大小的发育。近年来研究也发现, YAP 蛋白是 Hippo 信号通路中的靶因子, 是 Hippo 信号通路下游的一个转录激活子, 通过抑制 YAP 蛋白的活性调控细胞增生和凋亡之间的平衡, 从而抑制组织细胞过度生长。最新的研究发现 YAP 蛋白在胃癌和乳腺癌中等均存在高表达, 提示 YAP 可能作为一种癌基因, 促进了肿瘤的发生和发展。但是 YAP 基因及蛋白在肾癌中研究还未曾报道, 本研究拟从肾癌组织和癌旁正常肾组织中 YAP 蛋白的表达情况, 分析探讨其在肾癌中的表达意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2010 年 4 月至 2011 年 4 月重庆医科大学附属第一医院泌尿外科手术切除的 42 例肾癌及其距离肾癌组织 4 cm 以上的癌旁正常肾组织进行检测。42 例标本中男性 27 例, 女性 15 例, 年龄 36~77 岁, 平均 64 岁, 术后病理均证实为肾透明细胞癌。用作免疫组化标本全部经 4% 多聚甲醛固定过夜, 常规石蜡包埋切片, 切片厚度约 4~5 μm ; 用作 RT-PCR 的标本全部用 250 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌、灭酶的锡箔纸包装存放与液氮中 2 h 以上, 然后转移至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 主要试剂

兔抗人 YAP 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 生物技术有限公司); 免疫组化试剂盒和 DAB 显色剂购至北京中杉生物技术有限公司。总 RNA 抽提试剂盒 RNAiso Reagent 购自大连

宝生物工程有限公司, 逆转录试剂盒 (RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622) 购自 Fermentas 公司。DL1000 Marker 购自天根生物有限公司。Taq 酶 (2 $\times$ Taq PCR Master-Mix) 购自北京博迈德科技发展有限公司。YAP 内参引物均由上海生工有限公司设计合成。YAP 序列上游为: TGAA-CAAACGTCCAGCAAGATAC, 下游为: CAGCCCCCAAATG-AACAGTAG; 内参序列上游: ACCACCATGGAGAAGGCTGG, 下游: CTCAGTGTAGCCAGGATGC。

1.3 检测方法

1.3.1 RT-PCR (1) 组织中 RNA 的提取: 将 100 mg 组织标本转移至液氮预冷的研钵中, 用研杵反复研磨组织, 并不断加入液氮。直至组织成粉末状, 加入 RNAiso Reagent 1 ml, 室温静置 5 min, 移入 Eppendorf 管中, 然后离心 5 min, 将上清液转移至另一个 Eppendorf 管, 加入 200 μl 氯仿, 用力上下震荡 15~20 s, 充分乳化成乳白色后, 室温静置 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min, 吸取无色上清液转移至另一只 Eppendorf 管中, 切勿吸取出白色中间层, 加入等体积的异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温静置 10 min, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min, Eppendorf 管中出现白色沉淀, 弃去上清液, 小心沿着管壁加入 75% 乙醇洗涤沉淀 1 次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 5 min, 弃乙醇, 室温下干燥 2~3 min, 加入焦碳酸二乙酯 (Diethyl pyrocarbonate, DEPC) 处理水溶解 RNA, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。(2) RNA 样品鉴定: ①总 RNA 纯度鉴定: 取 1 μl 总 RNA 提取液在紫外光栅分光光度计测定 $A_{260\text{nm}}$ 、 $A_{280\text{nm}}$, 计算 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 值。在 1.8~2.0 之间为纯度合格; ②总 RNA 完整性鉴定: 取 1.5% 琼脂糖凝胶电泳时在 28S、18S、5S 处可见 RNA 条带, 28S/18S > 1 为完整性达到要求。(3) 逆转录合成 cDNA: 依次加入总 RNA 4 μl , oligo (dT) 18 primer 1 μl , RibolockTM Ribonuclease inhibitor 1 μl , 10 mmol/L dNTP mix 2 μl , 5 $\times$ reaction buffer 4 μl , RevertAidTM M-MLV EVERSE transcriptase 1 μl , DEPC 处理水 7 μl , 总共 25 μl 。反应条件分别为: 70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 终

止反应。(4)PCR 反应:在梯度 PCR 仪上进行,反应体系为 25 μ l,内含 cDNA 4 μ l,PCR MIX 12.5 μ l,上下游引物各 1 μ l, ddH₂O 6.5 μ l。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,32 个循环,循环结束后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。每 1 份 cDNA 样品都在相同条件下进行 YAP 及内参 mRNA 的检测。(5)电泳:取 0.24 g 琼脂糖加入 20 ml TAE 溶液,加热溶解,加入 1 μ l gold view,轻轻摇匀,冷却制胶。向胶每 1 孔中加入 4 μ l YAP PCR 产物和 2 μ l 内参,电压 80 V,跑电泳 30 min,然后在凝胶成像仪上观察并拍照,以 165 bp 处出现阳性条带表达为阳性,无明显条带出现为阴性表达。

1.3.2 免疫组化及判断标准 采用链霉素抗生物素-过氧化物酶两步法,简述如下:石蜡切片经脱蜡及水化、抗原修复和血清封闭后,在切片上滴加 1:100 抗 YAP 抗体,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱孵育 2 h 后,滴加二抗及链霉素抗生物素-过氧化物酶, DAB 显色后,苏木素复染,梯度酒精脱水、封片、拍照。以 PBS 液代替一抗作为阴性对照,以已知 YAP 染色阳性的肾癌组织切片作为阳性对照。判断标准:YAP 染色阳性者在细胞核(部分在细胞浆)有棕黄色颗粒沉着。要求细胞结构清晰,阳性细胞定位好,以同一显微镜倍数(40 $\times$)观察全片,选择 5 个高倍(400 $\times$)视野,合并计算所分析的 5 个不同视野着色细胞百分率及细胞核、胞浆的着色程度。根据染色程度及染色细胞百分率进行分析评定:基本不着色为 0 分,着色淡为 1 分,着色较深为 2 分;着色细胞占计数细胞百分率: $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分, $\geq 51\%$ 为 3 分,以每张切片染色程度和染色细胞百分率得分相乘的积为最后得分。得 0~1 分者判为阴性(-),得 2 分者判为弱阳性(+),得 3~4 分者判为中等阳性(++),得 6 分者判为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

采用卡方精确检测法,以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 检测 42 例肾癌和癌旁正常肾组织,42 例肾癌组织中,有 37 例表达阳性,阳性率为 88.10%,42 例癌旁正常肾组织中,有 6 例表达阳性,阳性率为 14.29%,两者比较差异显著,有统计学意义(图 1、表 1)。

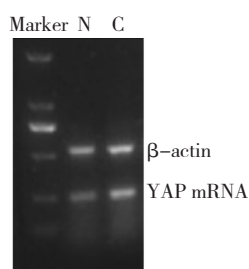


图 1 RT-PCR 检测 YAP mRNA 在肾癌及癌旁正常肾组织中的表达

Fig.1 Expression of YAP mRNA in renal carcinoma tissues and corresponding adjacent non-malignant tissues detected by RT-PCR

表 1 YAP mRNA 在肾癌及癌旁正常肾组织中的表达

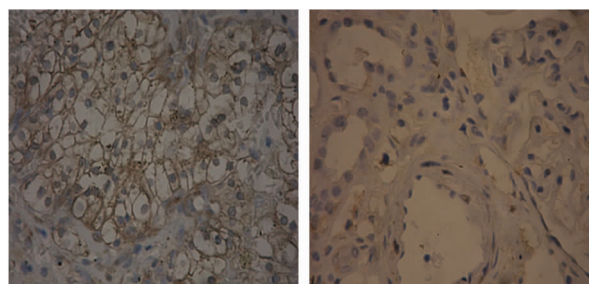
Tab.1 Expression of YAP mRNA in renal carcinoma tissues and corresponding adjacent non-malignant tissues

组织	总例数(n)	阳性	阴性	阳性率(%)
癌组织	42	37	5	88.10
癌旁正常肾组织	42	6	36	14.29

注: $\chi^2 = 45.79, P = 0.005$

2.2 免疫组化表达情况

YAP 在肾癌中的阳性表达率为 95.23%(40/42), 主要定位于细胞核及细胞浆,染色程度深,为强阳性或者中等阳性;YAP 在癌旁肾正常组织中也表达,阳性率为 30.95%(13/42),染色程度较浅,为弱阳性,且局限在集合管系统。可见 YAP 在肾癌组织中的表达明显高于癌旁肾正常组织($P < 0.05$),差异有统计学意义(图 2、表 2)。



A. 肾癌组织

B. 癌旁肾正常组织

图 2 免疫组化检测 YAP 蛋白在肾癌及癌旁肾正常组织中表达

Fig.2 Expressions of YAP protein in renal carcinoma tissues and corresponding adjacent non-malignant tissues detected by immunohistochemistry

表 2 YAP 蛋白在肾癌及癌旁肾正常组织中的表达

Tab.2 Expressions of YAP protein in renal carcinoma tissues and corresponding adjacent non-malignant tissues

组织	总例数(n)	阳性	阴性	阳性率(%)
癌组织	42	40	2	95.23
癌旁正常肾组织	42	13	29	30.95

注: $\chi^2 = 37.27, P = 0.005$

3 讨 论

随着现代分子生物学技术的飞速发展,人们对外界促癌、致癌因素以及肿瘤遗传因素的研究逐渐统一到了基因水平上来,发现肿瘤的发生发展是多种基因联合、循序的发生变异的结果,其中包括了癌基因和抑癌基因。目前已经发现的癌基因和抑癌基因不下数十种,那么究竟有多少与人类肿瘤相关的基因呢?随着对人类基因组密码的完全破译完成,相信这一问题将得到解决。近些年来在对果蝇的研究中发现,Hippo 信号转导通路通过多种肿瘤

抑制因子(Hop、Wts、Sav)组成的激酶链,磷酸化其靶因子 YkiS168 位点而抑制其转录共激活活性,从而维持细胞增生和凋亡间的平衡,如果该通路发生异常或 Yki 基因发生突变,将导致 Yki 基因的活化,那么细胞增生和凋亡之间平衡失调,肿瘤就发生了^[1]。研究又发现,在人类机体内存在着与果蝇 Hippo 信号通路中的各个靶因子的同源物(Yap-Yki、Mst1/2-Hpo、Hww45-Sav、Lats-Wts),YAP 基因作为人类 Hippo 信号通路中的关键靶因子,其与果蝇的 Yki 在结构上有 31%的一致性,生物学功能也类似。YAP 基因是 Hippo 信号通路中最关键的靶因子,其编码 1 种 65 kD 富脯氨酸磷蛋白,在生理情况下以磷酸化的形式存在,与 Hippo 通路中其他激酶处于高度保守状态,从而维持增生和凋亡的平衡^[2,3]。当 YAP 基因发生突变时,将导致肿瘤的发生,因此 YAP 基因作为 1 个可疑的癌基因近些年来已经成为肿瘤研究的热点。研究发现 Lats 能够与 YAP 直接相互作用,Lats1 能有效抑制 YAP 的表达,当 Lats1 基因敲除后,丧失了对 YAP 活性的抑制,YAP 失磷酸化并向细胞核转位,表达水平增高,转录共激活活性增强,从而促进了肿瘤的发生^[4]。Overholtzer 等^[5]研究发现,将 YAP 基因通过逆转录病毒转染至非致瘤性永生乳腺上皮细胞系 MCF10A 后,发现 YAP 基因可以促进其上皮间质化,生长因子非依赖性增生,凋亡抑制等一系列改变,所有这些表现正是细胞恶性转化的标志,表明 YAP 基因具有潜在的致瘤性。Wang 等^[6]利用免疫组化法分析 92 例非小细胞性肺癌发现,YAP 蛋白在癌组织的细胞核和细胞浆内都有表达,进一步结合临床资料分析,YAP 蛋白的过表达与非小细胞性肺癌的 TNM 分期密切相关,导致了非小细胞型肺癌的快速进展和预后不良。Da 等^[7]利用免疫组化技术检测 YAP 在正常胃黏膜、肠上皮化生、不典型增生及胃癌组织中的表达水平,发现 YAP 在不典型增生及胃癌组织中的阳性表达率显著高于正常胃黏膜组织,提示 YAP 可能作为致癌因子参与胃癌的发生发展。由此可见,YAP 的异常表达跟多种肿瘤的发生发展及其预后都紧密相关。

本实验通过研究 42 例肾癌和癌旁正常肾组织中 YAP 基因及蛋白的表达情况,发现其在肾癌组织中的表达明显强于癌旁正常肾组织,提示 YAP 作为一种可疑的癌基因,参与了肾癌的发生发展。而最新研究发现 Hippo-YAP 信号通路不但是调控器官大小发育的关键信号通路,而且与人类肿瘤的发生

密切相关^[8],YAP 是 Hippo 信号通路中的关键靶基因,故推测 Hippo-YAP 信号通路参与了肾癌的发生发展,可能成为调节肾癌发生发展的重要通路。Hippo-YAP 信号通路中 Lats1 基因丧失了对 YAP 活性的抑制,YAP 表达水平增高,转录共激活活性增强,促进上皮间质化,生长因子非依赖性增生,凋亡抑制,导致细胞增生和凋亡间失去平衡,这样肾癌就发生了,但是其具体发生发展机制还需要进一步研究。目前发现 YAP 基因及蛋白在肾癌中存在高表达,如果能够在接下来的实验中证明 YAP 基因及蛋白跟肾癌的分期分型密切相关,进一步证明 Hippo-YAP 信号通路中关键靶基因 Lats1、Mst、Sav 等在肾癌组织中的差异性表达,证明 Hippo-YAP 信号通路就是介导肾癌发生发展的关键信号通路,阐明 Hippo-YAP 通路中其他靶基因(Mst、Sav、Lats、TEAD 家族)在肾癌发生发展中的关键作用,那么 Hippo-YAP 信号通路就可以成为治疗肾癌的新靶位,将为肾癌的检测、诊断和基因治疗开辟新的道路。

参 考 文 献

- [1] Dong J, Feldmann G, Huang J, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in drosophila and mammals[J]. *Cell*, 2007, 130(6): 1120-1133.
- [2] Zhao B, Wei X, Li W, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control[J]. *Genes*, 2007, 21(21): 2747-2761.
- [3] Edgar B A. From cell structure to transcription: Hippo forges a new path[J]. *Cell*, 2006, 124(2): 267-273.
- [4] Zhang J, Smolen G A, Haber D A, et al. Negative regulation of YAP by LATS1 underscores evolutionary conservation of the drosophila Hippo pathway[J]. *Cancer Cell*, 2008, 68(8): 2789-2794.
- [5] Overholtzer M, Zhang J, Smolen G A, et al. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(33): 12405-12410.
- [6] Wang Y, Dong Q, Zhang Q, et al. Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(5): 1279-1285.
- [7] Da C L, Xin Y, Zhao J, et al. Significance and relationship between Yes-associated protein and survivin expression in gastric carcinoma and precancerous lesions[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(32): 4055-4061.
- [8] Zhao B, Lei Q Y, Guan K L, et al. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer[J]. *Curr Opin Cell Bio*, 2008, 20(6): 638-646.

(责任编辑:唐秋姗)