

肿瘤诊断与基因治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.01.002

Yes 相关蛋白在前列腺癌中的表达及意义

李文宾¹, 王德林¹, 盛 夏¹, 刘武江², 罗 照¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016;

2. 北京大学第一医院泌尿外科, 北京大学泌尿外科研究所, 北京 100034)

【摘要】目的:探讨 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)在前列腺癌(prostate cancer, PCa)组织、癌旁(pericarcinoma, PC)组织和良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)组织中的表达差异及其意义。**方法:**采用免疫组化技术检测 32 例 PCa, 15 例 PC 和 15 例 BPH 中 YAP 的表达情况;采用 Western blot 技术检测 15 例 PCa 和相应 PC 中 YAP 的表达水平。**结果:**32 例 PCa 中 YAP 阳性表达 25 例, 阳性率为 78.13%; 15 例 PC 中 YAP 阳性表达 4 例, 阳性率为 26.67%; 15 例 BPH 中未发现 YAP 阳性表达。组间差异有统计学意义($P=0.000$); YAP 的表达与 PCa 的临床分期、Gleason 评分有关(分别为 $P=0.019$; $P=0.012$)。临床分期越高, Gleason 评分越高, YAP 的阳性率越高。Western blot 显示 15 例 PCa 中 YAP 表达(0.723 ± 0.084)均高于相应 PC (0.455 ± 0.161), 差异具有统计学意义($P=0.006$)。**结论:**YAP 在 PCa 中的表达明显高于非肿瘤组织, 表现出明显的肿瘤特异性, 有望成为 PCa 临床诊断和治疗的一个新指标。

【关键词】前列腺癌; Yes 相关蛋白; 免疫组化; 蛋白质免疫印迹

【中图分类号】R697.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-01-08

Expression and significance of Yes-associated protein in prostate cancer

Li Wenbin¹, Wang Delin¹, Sheng Xia¹, Liu Wujiang², Luo Zhao¹

(1. Department of Urology Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Department of Urology Surgery, the First Hospital of Peking University, Institute of Urology Surgery Peking University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and clinical significance of Yes-associated protein(YAP) in tissues of prostate cancer(PCa), pericarcinoma(PC) and benign prostate hyperplasia(BPH). **Methods:** Expression of YAP protein of 32 cases of PCa, 15 cases of PC and 15 cases of BPH was investigated by immunohistochemistry. Moreover, different expression of YAP protein of 15 cases of PCa and its corresponding PC tissues were confirmed by Western blot. **Results:** Rate of YAP positive staining(78.13%, 25/32) in PCa tissues was higher than that in PC tissues(26.67%, 4/15) and YAP positive staining was not seen in BPH tissues. Staining differences between each group were statistically significant($P=0.000$). Furthermore, different expression of YAP protein was relevant with clinical stage and degree of differentiation($P=0.019$, $P=0.012$). The higher the clinical stage, the higher the Gleason score and YAP positive staining rate. Western blot demonstrated that YAP protein expression was higher in 15 cases of PCa(0.723 ± 0.084) than in corresponding PC tissues(0.455 ± 0.161), with statistically significant differences($P=0.006$). **Conclusions:** Expression of YAP protein is significantly higher in PCa tissues than in non-tumorous tissues, demonstrating obvious tumor specificity in PCa. YAP may be a new target in the diagnosis and treatment of PCa.

【Key words】prostate cancer; Yes-associated protein; immunohistochemistry; Western blot

前列腺癌(prostate cancer, PCa)在老年男性中发病率很高^[1]。近年来,随着我国人均寿命的不断增长,发病率持续上升,成为影响老年男性健康最常见的肿瘤之一^[2]。Hippo-YAP 信号通路是近年来发

现的一个具有促细胞凋亡和抑制细胞增殖的重要信号通路, Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)是其下游重要的核转录激活因子, 研究发现其在肿瘤中发生有重要作用^[3]。本研究通过收集 PCa 组织及癌旁(pericarcinoma, PC)组织、良性前列腺增生(benign prostate hyperplasia, BPH)组织, 应用免疫组化和 Western blot 技术并结合临床资料, 探究 YAP 在 PCa 中表达情况及意义。

作者介绍: 李文宾, Email: 549091525@qq.com,

研究方向: 泌尿系肿瘤。

通信作者: 王德林, Email: dlwangws@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30972999)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 收集重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 2009 年 3 月至 2012 年 7 月前列腺手术切除或穿刺的 PCa 标本 32 例, 15 例 BPH 标本, 15 例 PC 组织, 所有标本均病理学诊断明确。PCa 患者年龄最小 53 岁, 最大 81 岁, 平均 67 岁。依据 Gleason 评分标准, 2~4 分 8 例, 5~7 分 11 例, ≥ 8 分 13 例。TNM 分期 T₁ 期+T₂ 期 15 例、T₃ 期+T₄ 期 17 例。其中发生转移者 9 例, 未发生转移者 23 例。

1.1.2 试剂 免疫组化用兔抗人多克隆抗体 YAP 购买自北京博奥森生物科技有限公司, 免疫组化试剂盒二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色液购自北京中杉金桥生物公司。Western blot 所用蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司, 兔抗人多克隆抗体 YAP 购自北京欣兴唐生物科技有限公司, 山羊抗兔多克隆抗体购自北京博奥森生物科技有限公司, 电化学发光 (electro-chemiluminescence, ECL) 显色液购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 标本 10% 甲醛固定, 常规脱水、包埋切片。采用链霉素抗生物素-过氧化物酶 2 步法; 梯度酒精脱水, 3% 过氧化氢孵育 10 min, PBS 冲洗, 微波修复抗原, 山羊血清封闭, 加 1:100 稀释的一抗 4℃ 过夜, 对照组用 PBS 替代一抗作为阴性对照, 加山羊抗兔 IgG-HRP 多聚体 (二抗) 37℃ 孵育 40 min, PBS 冲洗, DAB 显色, 苏木精复染, 中性树脂封片。

1.2.2 Western blot 取总蛋白 40 μ g 进行定量分析, 行 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至硝酸纤维素 (nitrocellulose filter membrane, NC) 膜, 5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 1 h, 封 1:200 的一抗 4℃ 过夜, TBST 室温摇床上洗 3 次, 每次 15 min。再加入相应二抗 37℃ 温育 1 h, TBST 室温摇床上洗 3 次 每次 15 min, 加 ECL 显色液后凝胶成像系统显色, 以 β -actin 为内参照, 计算各蛋白条带的相对表达量, 统计分析。

1.2.3 结果判定 同一显微镜倍数观察全片, 选择 10 个高倍视野, 合并计算所分析的 10 个不同视野着色细胞的百分率和胞核、胞质的着色程度。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; 出现大量深棕色颗粒为 3 分; 着色细胞占计数细胞百分率: 0% 为 0 分, $\leq 25\%$ 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加为最后得分。0 分为阴性(-), 1~2 分为弱阳性(+), 3~4 分为中等阳性(++), 5~6 分为强阳性(+++)。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 17.0 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, 计数资料以百分率表示。均数间的比较采用 *t* 检验, 率的比较采用卡方检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 免疫组化结果

2.1.1 不同前列腺组织中的 YAP 表达情况 32 例 PCa 组织中 YAP 的阳性表达率为 78.13% (25/32), 主要定位于腺上皮的胞质和胞核, 染色程度深, 为强阳性和中等阳性 (图 1 箭头处); 15 例 PC 组织中 YAP 阳性表达率为 26.67% (4/15), 染色程度浅, 为弱阳性和中等阳性, 多为腺上皮细胞胞质表达, 胞核表达不明显 (图 2); BPH 组织中未见 YAP 表达 (图 3), 3 组间差异有统计学意义 ($\chi^2=28.251, P=0.000$)。2 组之间比较结果显示: YAP 的表达在 PCa 组织和 PC 组织之间差异有统计学意义 ($\chi^2=11.444, P=0.001$), PCa 组织和 BPH 组织之间差异有统计学意义 ($\chi^2=25.036, P=0.000$), 而在 BPH 组织和 PC 组织之间差异没有统计学意义 ($\chi^2=2.596, P=0.107$) (表 1)。

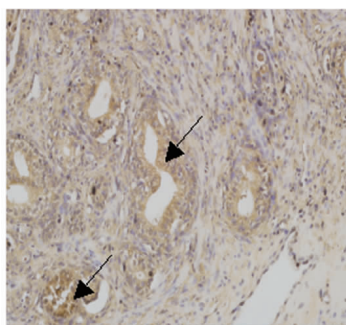


图 1 YAP 在 PCa 组织中的表达 (200 $\times$)

Fig.1 Expression of YAP in PCa tissues (200 $\times$)

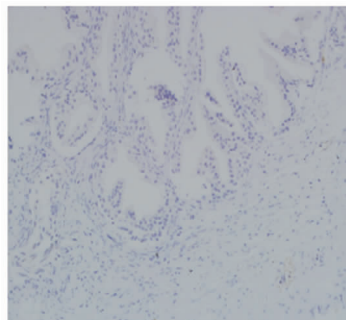


图 2 YAP 在 PC 组织中的表达 (200 $\times$)

Fig.2 Expression of YAP in PC tissues (200 $\times$)

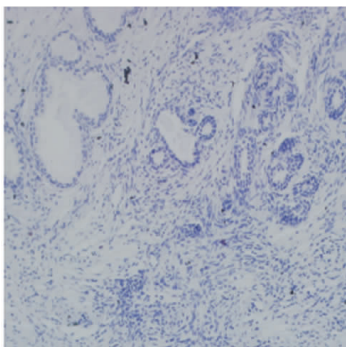


图 3 YAP 在 BPH 组织中表达 (200 $\times$)

Fig.3 Expression of YAP in BPH tissues (200 $\times$)

表 1 YAP 在前列腺不同组织类型中的表达情况

Tab.1 Expression of YAP in different prostatic tissues

病理类型	例数 (n)	YAP表达情况				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
癌旁组织	15	11	3	1	0	26.67
增生组织	15	15	0	0	0	0.00
癌组织	32	7	2	7	16	78.13
合计	62	33	5	8	16	46.77

2.1.2 YAP 与前列腺癌病理分期、分级的关系 Gleason 评分 ≥ 8 组,5~7组,2~4组间 YAP 表达阳性率差异有统计学意义($P=0.012$)。不同 TNM 分期的 PCa 中的 YAP 表达为: T_1+T_2 期组与 T_3+T_4 期比较,YAP 表达阳性率差异有统计学意义($P=0.019$)。术前前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA) ≥ 10 ng/ml 组 YAP 阳性率大于 PSA <10 ng/ml 组,差异有统计学意义($P=0.032$)。此外,虽然本研究中 YAP 阳性率在转移组大于无转移组,但差异无统计学意义($P=0.640$)(表2)。

表 2 YAP 表达与 PCa 患者临床病理分期、分级之间的关系

Tab.2 Correlation between expression of YAP and clinical pathological grading and staging

分组参数	例数 (<i>n</i>)	YAP表达情况				阳性率 (%)	<i>P</i> 值
		-	+	++	+++		
Gleason评分(分)							
2 ~ 4	8	4	1	3	0	50.0	0.012
5 ~ 7	11	3	1	2	5	72.7	
≥ 8	13	0	0	2	11	100.0	
TNM分期							
T ₁ 期+T ₂ 期	15	6	1	3	5	60.0	0.019
T ₃ 期+T ₄ 期	17	1	1	4	11	94.1	
转移情况							
有	9	1	0	1	7	88.9	0.640
无	23	6	2	6	9	73.9	
术前 PSA(ng/ml)							
<10	11	5	1	3	2	54.5	0.032
≥10	21	2	1	4	14	90.5	

2.2 Western blot 检测 YAP 的表达

Western blot 结果显示,YAP 在 PC 组织中低表达,而在 PCa 组织中高表达(图 4)。以 YAP 和 β -actin 2 种蛋白条带的面积与灰度乘积的比值为比较变量,对蛋白条带分析结果显示:PCa 中 YAP 的相对定量平均值(YAP/ β -actin)为 0.723 ± 0.084 ,PC 组织(YAP/ β -actin)中的值为 0.455 ± 0.161 ;两者表达差异有统计学意义($t=5.76, P=0.006$)(图 5)。

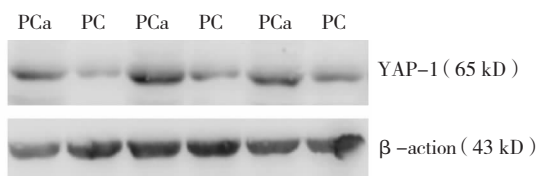


图 4 YAP 在 PCa 和 PC 中的表达

Fig.4 Expression of YAP protein in PCa and PC

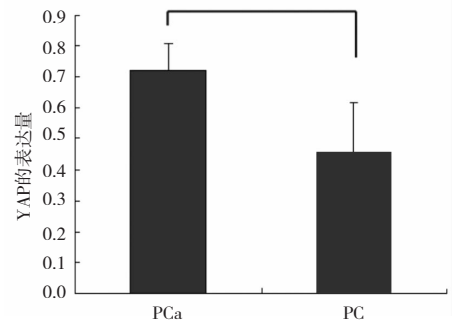


图 5 YAP 在 PCa 和 PC 中的相对定量值分析

Fig.5 Relative quantitative analysis of expression of YAP in PCa and PC

3 讨论

PCa 多发于 50 岁以上的男性,据 2011 年的权威统计,全球 PCa 发病率占男性恶性肿瘤的第 2 位,致死率为第 6 位。2008 年 PCa 占男性所有癌症新增病例数的 14.00%,占有因癌症而死亡人数的 6.00%^[1]。PSA 为目前临床上常用的 PCa 检测标志物,但其检测总体结果受很多因素影响^[4]。对于常规 PSA 筛查能否降低死亡率和预测病人的预后一直饱受争议,国际权威的新英格兰杂志 2012 年 8 月的 1 项研究显示 PSA 筛查会带来长期的诊断后效应,获益也会被质量修正生命年减少而部分抵消,并且筛查没有降低总体死亡率^[9]。这也将美国预防服务工作组在 1 项建议草案中反对常规 PSA 筛查的争议变得更加激烈。因此寻找一个更精确的筛查检测因子成为亟待解决的问题。

Hippo-YAP 是新发现的 1 个干细胞信号转导通路,该通路有促细胞凋亡和抑制细胞增殖 2 种不同的作用^[6]。核转录因子 YAP 位于该通路下游,为该通路核心部分,上游的 $Mst1/2$ 、 $Ww45$ 、 $Lats1/2$ 、 $Mob1$ 等通过磷酸化和促进蛋白的质/核转位对 YAP 起负性调节作用^[7-8]。根据目前对肝癌、胰腺导管腺癌、结肠腺癌、肺腺癌、卵巢浆液性腺癌^[9-11]的研究,证实 YAP 为癌基因,但也有发现 YAP 为乳腺癌抑癌基因的报道^[12]。对于 YAP 在 PCa 中的作用,国内外目前没有相应的报道。

本研究选取了 32 例不同分期、分级的 PCa 组织,分别用 15 例 BPH 组织、PC 组织做对照。免疫组化检测后发现 32 例 PCa 组织中 YAP 阳性率为 78.13%,15 例 PC 组织中 YAP 阳性率为 26.67%,15 例 BPH 组织中未发现阳性表达。本研究结果显示 PCa 组织中 YAP 表达明显升高;其表达量与 PCa 的

肿瘤诊断与基因治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.01.003

Bmi-1-siRNA 对食管癌细胞株 EC9706 的影响

刘 霞¹, 曹关义², 程慧敏¹, 李维前¹, 马云松³

(徐州医学院附属第三医院 1. 病理科; 2. 普外科; 3. CT 室, 徐州 221003)

【摘要】目的:探讨 Bmi-1-siRNA 对食管癌 EC9706 细胞的影响。**方法:**将不同浓度(50、100、150 nmol/L)的 Bmi-1-siRNA 转染 EC9706 细胞 24、48、72 h, MTT 法检测各组各时间段细胞增殖情况, 免疫细胞化学检测转染后 EC9706 细胞内 Bmi-1、端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、P16 蛋白的表达, 原位杂交方法检测 Bmi-1 mRNA 的表达。**结果:**Bmi-1-siRNA 对 EC9706 细胞的生长抑制率明显升高, 且具有时间依赖性和剂量依赖性($F=1.322, 2.881, P<0.001$); EC9706 细胞中 Bmi-1、hTERT 蛋白表达明显降低, P16 蛋白表达升高($F=12.229, 23.556, 19.414, P<0.001$)。**结论:**Bmi-1-siRNA 有效抑制 EC9706 细胞的增殖, 其机制可能为降低 Bmi-1 mRNA 及 Bmi-1、hTERT 蛋白的表达, 上调 P16 蛋白的表达。

【关键词】Bmi-1; RNA 干扰; 食管癌**【中图分类号】**R735.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-07-02

作者介绍: 刘 霞 Email: wbtiger211@163.com,

研究方向: 肿瘤病理学。

通信作者: 程慧敏, Email: chenghuimin530323@yahoo.com.cn。

分期, 分级有关。在 BPH 组织中没有发现 YAP 的阳性表达, 说明 YAP 在 PCa 中是一个肿瘤特异性的基因。同时发现, YAP 的阳性率与 PCa 患者术前 PSA 是否高于 10 ng/ml 有明显的相关性, 之所以选择 10 ng/ml 作为分界值, 是因为有研究指出 PSA 高于此值的病人, PCa 诊断的准确性显著高于术前 PSA 在 4~10 ng/ml 之间的患者^[13]。本研究中, 虽然 YAP 的阳性率转移组大于未转移组, 但组间差异无统计学意义, 当然这有可能是样本总量偏少的原因。本研究 Western blot 选取的 15 对前列腺组织, 结果显示 PCa 组织中 YAP 的表达量明显高于 PC 组织, 差异有统计学意义。

综上所述, YAP 的表达在 PCa 组织和非肿瘤组织中存在统计学差异, 并且与 PCa 现行的分期, 分级有关。有必要对其进行深入研究, 以期 YAP 能成为 PCa 诊断的一个新标准和指导 PCa 预后的一个独立的危险因素。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] 李 鸣, 张思维, 马建辉, 等. 中国部分市县前列腺癌发病趋势比较研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2009, 30(6): 368-370.
- [3] Zhao B, Lei Q Y, Guan KL. The Hippo-YAP pathway: new connec-

tions between regulation of organ size and cancer[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(6): 638-646.

[4] 赵耀瑞, 徐 勇, 张殿举, 等. 血清 PSA、PSAD 和 PSAT 在前列腺穿刺活检中的意义[J]. 中华泌尿外科杂志, 2005, 26(9): 622-625.

[5] Nagata M, Tanimoto T, Kami M. Quality-of-life effects of prostate-specific antigen screening[J]. N Engl J Med, 2012, 367(19): 1861-1862.

[6] Pan D. Hippo signaling in organ size control[J]. Genes Dev, 2007, 21(8): 886-897.

[7] Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond [J]. Development, 2011, 138(1): 9-22.

[8] Zeng Q, Hong W. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals[J]. Cancer Cell, 2008, 13(3): 188-192.

[9] Liu AM, Poon RT, Luk JM. MicroRNA-375 targets hippo-signaling effector YAP in liver cancer and inhibits tumor properties[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(3): 623-627.

[10] Guo J, Kleeff J, Zhao Y, et al. Yes-associated protein (YAP65) in relation to Smad7 expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Int J Mol Med, 2006, 17(5): 761-767.

[11] 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.

[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] Saema A, Kochakarn W, Lertsithichai P. PSA density and prostate cancer detection[J]. Med Assoc Thai, 2012, 95(5): 661-666.

(责任编辑: 关蕴良)