

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000610

慢病毒介导 shRNA 沉默 YAP 基因对人前列腺癌 LNCaP 细胞增殖、凋亡及其雄激素受体的影响

李美材¹, 何江², 吴文强³, 黄亮亮¹, 曾强锋¹, 曹建佳¹,陈柯宏¹, 盛夏¹, 李文宾¹, 王德林¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属大学城医院消化神经中心, 重庆 401331;

3. 重庆医科大学附属第一医院綦江区人民医院泌尿外科, 重庆 401420)

【摘要】目的:探讨慢病毒介导 shRNA 沉默 Yes-相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)基因对人激素依赖性前列腺癌细胞株 LNCaP 细胞增殖、凋亡及其雄激素受体(androgen receptor, AR)的影响。**方法:**3 条针对 YAP 基因的 shRNA 慢病毒干扰载体感染 LNCaP 细胞, 经嘌呤霉素筛选后建立稳定感染细胞系, real-time PCR、Western blot 分别检测感染后各组细胞 YAP、AR mRNA 和蛋白水平; 选取沉默效果最佳 shRNA 慢病毒干扰载体组, 以细胞增殖/毒性检测 (cell counting kit-8, CCK-8)、平板克隆形成实验(colony formation)检测 LNCaP 细胞增殖能力; 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测 LNCaP 细胞凋亡改变。**结果:**重组慢病毒成功感染前列腺癌 LNCaP 细胞, 经嘌呤霉素筛选后感染效率达 95% 以上, 获得稳定沉默 YAP 基因 LNCaP 细胞系。与空白对照组和阴性对照组比较, 感染 shRNA 慢病毒干扰载体各组中 YAP、AR mRNA 及蛋白表达水平明显下调($P=0.000$), 细胞增殖受到明显抑制($P=0.000$), 细胞凋亡明显增加($P=0.000$)。**结论:**慢病毒介导 shRNA 沉默 YAP 基因能有效下调 YAP 在 LNCaP 细胞中表达, 并抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡; YAP 可能作为 AR 配体参与 AR 信号通路的调节。

【关键词】前列腺癌; 雄激素受体; Yes-相关蛋白; 慢病毒**【中国分类号】**R737.25**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-11-18

Effects of lentivirus-mediated shRNA silencing YAP gene on proliferation, apoptosis, and androgen receptor of human prostate cancer cell line LNCaP cells

Li Meicai¹, He Jiang², Wu Wenqiang³, Huang Liangliang¹, Zeng Qiangfeng¹,Cao Jianjia¹, Chen Kehong¹, Sheng Xia¹, Li Wenbin¹, Wang Delin¹

(1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Gastroenterology and Neurology Center, University-Town Hospital of Chongqing Medical University;

3. Department of Urology, Qijiang People's Hospital, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of lentivirus-mediated shRNA silencing Yes-associated protein(YAP) gene on proliferation, apoptosis, and androgen receptor of hormone dependent human prostate cancer LNCaP cells. **Methods:** Three shRNA for YAP gene lentiviral interference vectors were infected into LNCaP cells, then the LNCaP cells stably knockdown YAP gene expression were screened by puromycin. Real-time quantitative PCR(real-time PCR) and Western blot were used to detect mRNA and protein expression of YAP and androgen receptor(AR) after lentiviral interference vectors being infected respectively. shRNA lentiviral vector

with the best silence efficiency was acted as experiment group. CCK-8(cell counting kit-8) assay and colony formation were applied to evaluate the cell proliferation in LNCaP cells. Apoptosis of LNCaP cells was examined by flow cytometry(FCM). **Results:** YAP-shRNA lentiviral interference vectors were successfully infected into LNCaP cells. The infection efficiency of lentiviral interference vectors was more than 95% after puromycin selection and the stable YAP knockdown in LNCaP cells

作者介绍:李美材, Email: limeicai2014@163.com,

研究方向: 泌尿系统肿瘤的基因治疗。

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); 重庆市自然科学基金资助项目(编号:cqpc2012jja1698); 重庆市卫生局基金资助项目(编号:2013-2-082); 重庆市卫生和计划生育委员会基金资助项目(编号:20143061)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150405.2053.009.html>
(2015-04-05)

was established. Compared with those in control group and negative control group, expressions of YAP mRNA and protein were significantly reduced after YAP-shRNA lentiviral interference vectors being infected ($P=0.00$), meanwhile expressions of AR mRNA and protein were also significantly down-regulated ($P=0.000$); in YAP-shRNA lentiviral interference vectors group, cell proliferation was inhibited, and apoptosis was increased significantly ($P=0.000$). **Conclusions:** lentivirus-mediated shRNA silencing YAP gene can down-regulate the expression of YAP gene, inhibit the proliferation and promote apoptosis in LNCaP. YAP may act as a ligand of AR and regulate androgen receptor signaling pathway.

[Key words] prostate cancer; androgen receptor; Yes-associated protein; lentivirus

前列腺癌(prostate cancer, PCa)在欧美国家为除肺癌外男性最常见恶性肿瘤,国际癌症研究机构数据显示其发病率和死亡率呈持续升高^[1]。随着我国人口老龄化进程加剧及饮食结构改变,我国前列腺癌发病率也逐渐增加^[2]。前列腺癌经过去势治疗,随着时间延长,大多数都将复发,对去雄激素治疗产生抵抗,进展成为去势抵抗前列腺癌(castrate-resistant prostate cancer, CRPC),最终 34%病人产生肿瘤转移,对其治疗异常困难^[3]。在 CRPC 进展中 AR 发挥着关键作用,通过调控大量基因表达影响前列腺癌进展^[4-6]。Yes-相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)即 Yes 相关蛋白是 Hippo 信号通路中关键因子,作为一个候选癌基因,能促进细胞增殖、抗凋亡、诱导上皮间质转化、产生药物抵抗、影响细胞生存能力和促进肿瘤发生发展^[7-8]。鉴于活化状态 YAP 和 AR 均定位于胞核,且在正常乳腺组织中 YAP 表达与雌激素受体(estrogen receptor, ER)和孕激素受体(progesterone receptor, PR)密切相关,表明 YAP 与 AR 可能存在相互作用^[9]。为进一步研究 YAP 在前列腺癌进展中作用,及其与雄激素受体是否存在联系,本课题组设计慢病毒介导 YAP 基因干扰,以观察对前列腺癌 LNCaP 细胞雄激素受体及其增殖、凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人前列腺癌细胞系 LNCaP 购自 ATCC 细胞库,PRMI 1640 培养基、普通胎牛血清购自 Hyclone 公司;Trizol 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒及 SYBR Premix Ex Taq™ II 等购自大连宝生物工程有限公司(Takara);嘌呤霉素购自 sigma 公司;YAP 兔抗人单克隆抗体、AR 兔抗人单克隆抗体购自 Abcam 公司;RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、0.25% 胰酶消化液、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔 IgG 抗体等购自上海碧云天生物技术有限公司;

CCK-8 试剂购自广州奕源生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LNCaP 细胞常规培养在含有 10%胎牛血清 RPMI-1640 培养基,于 37℃、5%CO₂、饱和湿度孵育箱中培养,每 2~3 d,用 0.25%胰酶将贴壁生长的细胞消化后传代培养。

1.2.2 实验分组 real-time PCR 及 Western blot 将细胞分为 5 组:YAP-shRNA1 组、YAP-shRNA2 组、YAP-shRNA3 组、阴性对照组、空白对照组。阴性对照组用无意义 shRNA 慢病毒颗粒,YAP-shRNA1 组、YAP-shRNA2 组、YAP-shRNA3 组用针对 YAP 基因 shRNA 慢病毒颗粒,感染对数生长期 LNCaP 细胞;空白对照组为未经处理对数生长期 LNCaP 细胞。克隆形成实验、CCK-8、细胞凋亡检测分为 3 组:空白对照组、阴性对照组、YAP-shRNA1 组。

1.2.3 慢病毒干扰载体的构建 以人 YAP(GI:NM-006106)基因设计 3 条特异性 shRNA 序列和 1 条无意义阴性对照序列,合成表达 shRNA 的互补 DNA 单链(表 1),将各 DNA 单链退火形成带黏性末端的双链,链接到线性化的 pMAGIC7.1 载体后转化 DH5 α 感受态细胞,提取质粒进行酶切鉴定并测序,再用 293T 细胞进行慢病毒包装,各组慢病毒重组干扰载体均含绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)和嘌呤霉素抗性基因。慢病毒干扰载体由上海生博生物医药科技有限公司进行测序鉴定、病毒包装和滴度检测。

1.2.4 嘌呤霉素筛选及 shRNA 慢病毒感染细胞 确定嘌呤霉素的最佳筛选浓度, LNCaP 细胞预先使用 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素作浓度梯度筛选,连续观察 7 d,以细胞全部死亡最低浓度为最佳浓度。慢病毒感染前,取对数生长期 LNCaP 细胞接种到 6 孔板,并保证感染时细胞汇合率介于 30%~40%,加入 YAP-shRNA1、YAP-shRNA2、YAP-shRNA3、YAP-shRNA3、阳性对照 慢病毒工作液进行感染,每孔感染复数为 20(multiplicity of infection, MOI),并加入感染增强剂 Polybrene,终浓度为 5.0 $\mu\text{g/ml}$,需同时设立空白对照组,感染 12 h 后更换常规培养基,孵育箱中培养 96 h 后更换为含嘌呤霉素(预实验证实最佳筛选浓度为 2.0 $\mu\text{g/ml}$)培养基继续培养 7 d 以上,荧光显微镜下观察感染效率,感染效率=(荧光视野下细胞数/普通光视野下细胞数) $\times 100\%$,将筛选后 LNCaP 细胞进行扩大培养,用于后续实验。

1.2.5 总 RNA 提取及 real-time PCR 采用 Trizol 法,分别提

表 1 3 条 shRNA、1 条阴性对照序列及其二者互补 DNA 单链

Tab.1 Three interference sequences, one negative control sequence and complementary single-stranded DNA

各组序列	5'	STEMP	Loop	STEMP	3'
YAP-shRNA1					
正义链	CCGG	CCGTTTCCCAGACTACCTT	CTCAAGAGA	AAGGTACTCTGGGAAACGG	TTTTTTG
反义链	AATTCAAAAA	CCGTTTCCCAGACTACCTT	TCTCTTGAG	AAGGTACTCTGGGAAACGG	
YAP-shRNA2					
正义链	CCGG	GCTCATTCCTCTCCAGCTT	CTCAAGAGA	AAGCTGGAGAGGAATGAGC	TTTTTTG
反义链	AATTCAAAAA	GCTCATTCCTCTCCAGCTT	TCTCTTGAG	AAGCTGGAGAGGAATGAGC	
YAP-shRNA3					
正义链	CCGG	CCTTAACAGTGGCACCCTAT	TTCAAGAGA	ATAGGTGCCACTGTTAAGG	TTTTTTG
反义链	AATTCAAAAA	CCTTAACAGTGGCACCCTAT	TCTCTTGAA	ATAGGTGCCACTGTTAAGG	
阴性对照序列					
正义链	CCGG	TTCTCCGAACGTGTCACGT	TTCAAGAGA	ACGTGACACGTTCCGAGAA	TTTTTTG
反义链	AATTCAAAAA	TTCTCCGAACGTGTCACGT	TCTCTTGAA	ACGTGACACGTTCCGAGAA	

取各组总 RNA, 紫外分光光度计进行定量, 其吸光度 (absorbance, A) 值 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 范围在 1.8~2.0 为 RNA 纯度合格, 按逆转录试剂盒说明书逆转录为 cDNA。引物序列 YAP: 上游: 5'-CAGTGGACTAAGCATGAGCA-3', 下游: 5'-TCAAGG-TAGTCTGGGAAACG-3', 141 bp; AR^[10]: 上游: 5'-CCTGG-CTTCCGCAACTTACAC-3', 下游: 5'-GGACTTGTGCATGCGG-TACTCA-3', 168 bp; GAPDH: 上游: 5'-CAGGAGGCATTGCT-GATGAT-3', 下游: 5'-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3', 138 bp。以 GAPDH 为内参, 进行 qRT-PCR, 反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 95 °C 终延伸 10 s。3 次独立实验后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法统计数据。 $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组目的基因 Ct 平均值} - \text{实验组内参基因 Ct 平均值}) - (\text{对照组目的基因 Ct 平均值} - \text{对照组内参基因 Ct 平均值})$ 。

1.2.6 Western blot 检测 YAP 和 AR 蛋白表达 收集 YAP-shRNA1 组、YAP-shRNA2 组、YAP-shRNA3 组、阴性对照组各组细胞, RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。1/4 体积蛋白上样缓冲液 loading buffer 与之混合后 100 °C 变性 5 min。以每孔 50 μg 蛋白上样量, 经 10% 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 80 V 电压下电泳, 电泳产物转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。之后加入一抗 4 °C 过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗 37 °C 孵育 1 h, 最后经 TBST 充分漂洗后, ECL 化学发光显影, Quantity One 软件分析条带灰度值, 以 β -actin 作为内参照, 分析 YAP 或 AR 相对表达量。

1.2.7 CCK-8 检测增殖 取沉默效果最佳 YAP-shRNA1 干扰载体组、阴性对照、空白对照组 LNCaP 细胞。按 3000/孔接种于 96 孔板中, 每组设 3 个复孔。分别于接种后 24、48、72、96 h, 加入 CCK-8 溶液 10 μl , 37 °C 孵育 2 h。酶标仪在 450 nm 波长处测定 A 值, 并计算细胞增殖抑制率 (inhibitory rate, IR), $IR = [1 - \text{实验组 A 值} / \text{空白对照组 A 值}] \times 100\%$, 实验重复 3 次。

1.2.8 平板克隆形成实验 取同上述 YAP-shRNA1 干扰载体组、阴性对照组, 及空白对照组 LNCaP 细胞, 细胞计数后

以 300 个每孔接种于 6 孔板, 每组 3 个复孔, 置于 37 °C、5% CO_2 孵育箱中静置培养 2 周终止培养, PBS 清洗后每孔加入纯甲醇 500 μl 固定 15 min, 去固定液按 Giemsa 染液操作说明染色, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。单个细胞克隆数大于 50 为克隆阳性, 克隆形成率 = (克隆形成数/接种细胞数) $\times 100\%$, 实验重复 3 次。

1.2.9 细胞凋亡检测 取同上述 YAP-shRNA1 干扰载体组、阴性对照组, 及空白对照组 LNCaP 细胞, 用 0.25% 胰酶消化, PBS 清洗 2 次, 离心后加入 1 ml PBS 吹打均匀, 分别加入 AnnexinPE/7-ADD, 室温避光孵育 15 min, 测定细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件, 实验结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较用单因素方差分析, 采用 LSD-t 法进行组间两两比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 嘌呤霉素筛选预实验确定最佳筛选浓度

考虑到 LNCaP 细胞为弱贴壁细胞, 对各种药物处理较为敏感, 设计出跨度较小浓度梯度作为筛选浓度。实验发现经嘌呤霉素浓度 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 培养 7 d 后, 细胞全部死亡, 证实其为最佳筛选浓度 (图 1)。

2.2 经嘌呤霉素筛选后感染效率的观察

YAP-shRNA1 组、YAP-shRNA2 组、YAP-shRNA3 组慢病毒干扰载体及阴性对照组慢病毒载体携带嘌呤霉素抗性基因, LNCaP 在病毒感染 96 h 后可耐受嘌呤霉素筛选, 经过 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素筛选 7 d 后, 通过倒置荧光显微镜观察到各组均有绿色荧光蛋白表达, 表明感染成功, 经计算 3 组慢病毒干扰载体组和阴性对照组各组感染效率达 95% 以上 (图 2)。

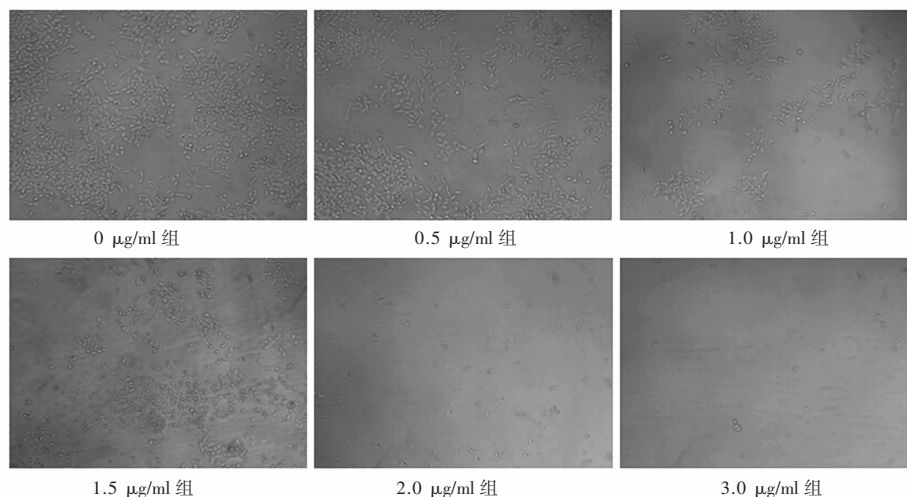


图 1 光学显微镜下不同浓度嘌呤霉素筛选 LNCaP 细胞 7 d 后细胞生长状况 (100 ×)

Fig.1 LNCaP cells grow for 7 days in different concentrations of puromycin under optical microscope (100 ×)

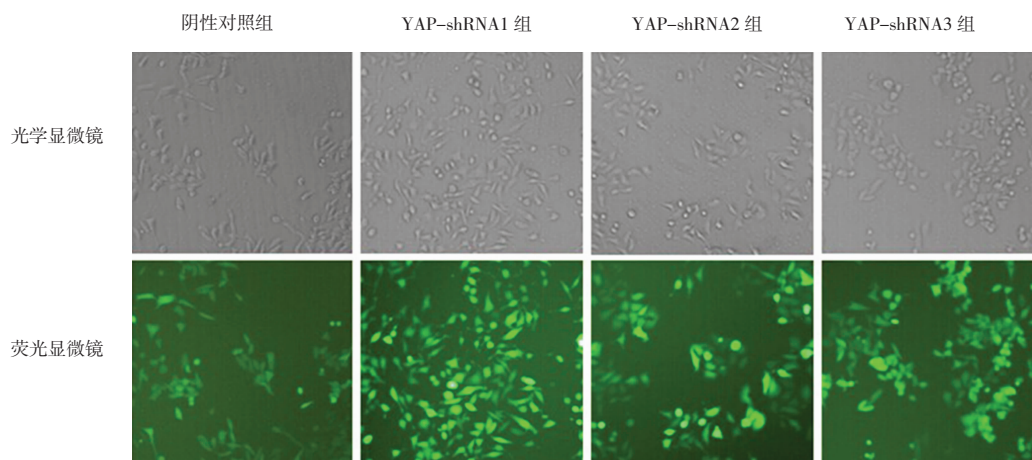


图 2 光学显微镜和荧光显微镜下 LNCaP 细胞绿色荧光蛋白表达 (100 ×)

Fig.2 Expressions of GFP in LNCaP cells observed under optical microscope and fluorescence microscope (100 ×)

2.3 慢病毒感染后各组 YAP 及 AR mRNA 表达情况

Real-time PCR 显示,各组均表达 YAP 及 AR mRNA,与空白对照组相比,YAP-shRNA1 组、YAP-shRNA2 组、YAP-shRNA3 组、阴性对照组中 YAP mRNA 的表达水平分别为 0.068 ± 0.007 、 0.130 ± 0.012 、 0.412 ± 0.028 、 0.969 ± 0.040 ,组间比较差异有统计学意义 ($F=848.235$, $P=0.000$),其 YAP-shRNA1 组、YAP-shRNA2 组、YAP-shRNA3 组 YAP mRNA 表达下调 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$),而阴性对照组与空白对照组比较,YAP mRNA 表达无统计学意义 ($P=0.211$);其 AR mRNA 在各组表达水平分别为 0.528 ± 0.026 、 0.512 ± 0.032 、 0.668 ± 0.053 、 0.973 ± 0.017 ,组间比较差异有统计学意义 ($F=110.650$, $P=0.000$),YAP-shRNA1 组、YAP-shRNA2 组、YAP-shRNA3 组中 AR mRNA 明显降低 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$),阴性对照组与空白对照组比较,AR mRNA 表达无统计学意义 ($P=0.521$),表明慢病毒干扰 YAP 后能不同程度的

抑制 YAP、AR mRNA 的表达(图 3)。

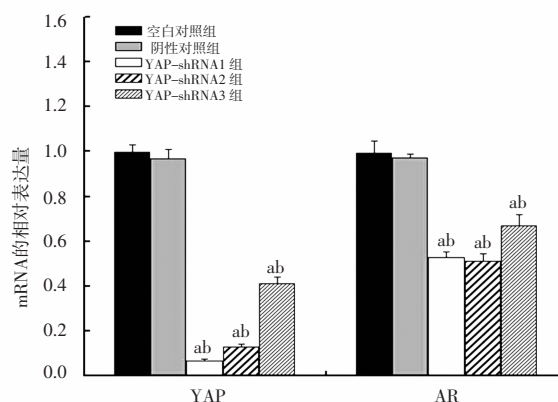
注:a,与空白组比较, $P<0.05$;b,与阴性对照组比较, $P<0.05$

图 3 各组不同 mRNA 的表达水平

Fig.3 The expression of mRNA in different groups

2.4 Western blot 检测慢病毒感染后各组 YAP 及 AR 蛋白表达情况

Western blot 结果显示 YAP-shRNA1 组、YAP-shRNA2 组、YAP-shRNA3 组中 YAP 蛋白表达量较空白对照组明显降低 ($P=0.000, P=0.001, P=0.000$), 阴性对照组与空白对照组比较, 无明显差异 ($P=0.927$), 且可以看出沉默效果最佳的为 YAP-shRNA1 组。其 AR 蛋白在 YAP-shRNA1 组、YAP-shRNA2 组、YAP-shRNA3 组表达量, 较空白对照组都有不同程度的降低 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$), 而阴性对照组与空白对照组比较, AR 蛋白表达无差异 ($P=0.560$), 虽然各组 AR 蛋白下降程度与 YAP 蛋白下降程度不一致, 但可观察到 AR 蛋白受到 YAP 蛋白下调而同样受到影响, 表明 AR 受到 YAP 正性调节影响 (图 4、表 2)。

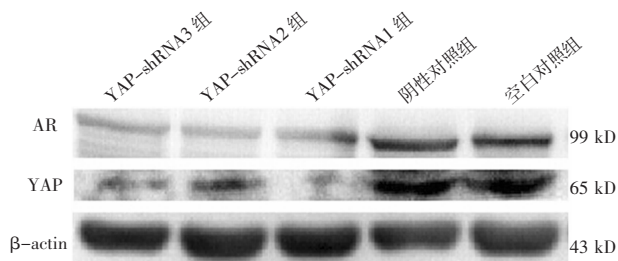


图 4 Western blot 检测各组 YAP、AR 蛋白的表达

Fig.4 YAP and AR protein expression in different groups detected by Western blot

表 2 各组不同蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.2 Different protein expressions in different groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	YAP	AR
空白对照组	0.603 ± 0.062	0.494 ± 0.035
阴性对照组	0.599 ± 0.067	0.476 ± 0.048
YAP-shRNA1组	0.107 ± 0.034^{ab}	0.274 ± 0.037^{ab}
YAP-shRNA2组	0.400 ± 0.052^{ab}	0.192 ± 0.023^{ab}
YAP-shRNA3组	0.265 ± 0.038^{ab}	0.288 ± 0.042^{ab}
F 值	50.571	37.059
P 值	0.000	0.000

注: a, 与空白组比较, $P<0.05$; b, 与阴性对照组比较, $P<0.05$

2.5 YAP 基因沉默对 LNCaP 细胞增殖能力改变

CKK-8 检测结果显示, YAP-shRNA1 组 A 值较空白对照组明显减小, 从 24 h 开始表现为明显差异 ($P<0.05$), 表明其生长受到抑制, 24、48、72、96 h 生长抑制率分别为 28.33%、47.50%、61.84%、57.11%; 各时间点空白对照组与阴性对照组间 A 值无显著差异 (24 h $P=0.724$, 48 h $P=0.448$, 72 h $P=0.681$, 96 h $P=0.111$) (表 3)。克隆形成实验结果显示, 经过 14 d 静置培养, 克隆细胞在荧光显微镜下仍然表达较强的绿色荧光, 进一步说明本实验建立了稳定感染的 YAP 基因沉默的 LNCaP 阳性克隆细胞系, 其 YAP-shRNA1 组克隆形成率较

空白对照组克隆形成率明显降低 ($P=0.000$), 阴性对照组与空白对照组比较无明显差异 ($P=0.158$) (图 5、表 4), 以上表明沉默 YAP 基因能显著抑制其增殖。

表 3 各组细胞的 $A_{450\text{nm}}$ ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.3 $A_{450\text{nm}}$ values of cells in different groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	0.360 ± 0.029	0.640 ± 0.016	1.402 ± 0.053	1.942 ± 0.054
阴性对照组	0.351 ± 0.044	0.620 ± 0.045	1.388 ± 0.040	1.867 ± 0.047
YAP-shRNA1组	0.258 ± 0.011^{ab}	0.336 ± 0.022^{ab}	0.535 ± 0.008^{ab}	0.833 ± 0.048^{ab}
F 值	9.969	92.213	492.239	469.057
P 值	0.012	0.000	0.000	0.000

注: a, 与空白组比较, $P<0.05$; b, 与阴性对照组比较, $P<0.05$

表 4 各组 LNCaP 细胞克隆形成率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.4 Colony formation rate of LNCaP cells in different groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	克隆形成率
空白对照组	39.50 ± 3.15
阴性对照组	36.20 ± 1.59
YAP-shRNA1组	18.84 ± 2.54^{ab}
F 值	58.646
P 值	0.000

注: a, 与空白组比较, $P<0.05$; b, 与阴性对照组比较, $P<0.05$

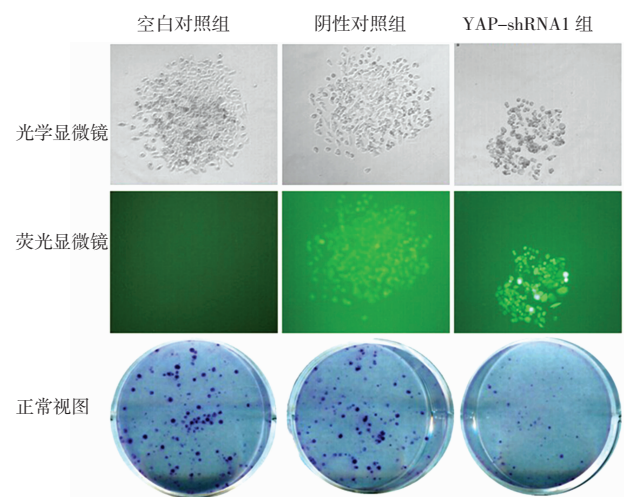


图 5 光学显微镜 (100×)、荧光显微镜 (100×)、正常视图下各组克隆形成实验结果

Fig.5 Results of colony formation under optical microscope (100×), fluorescence microscope (100×), and normal human eyes

2.6 YAP 基因沉默对 LNCaP 细胞凋亡的影响

流式细胞仪 (FCM) 对各组进行细胞凋亡检测, YAP-shRNA1 组凋亡率明显高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P=0.000$), 而阴性对照组和空白对照组比较, 二者无统计学

意义 ($P=0.847$) (表 5、图 6), 表明沉默 YAP 基因能够诱导 LNCaP 细胞凋亡。

表 5 FCM 检测各组 LNCaP 细胞凋亡率 ($\%, \bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.5 Apoptosis rate of LNCaP cells by FCM ($\%, \bar{x} \pm s, n=3$)

分组	凋亡率
空白对照组	5.35 ± 0.68
阴性对照组	5.21 ± 0.88
YAP-shRNA1组	28.51 ± 1.02^{ab}
<i>F</i> 值	710.124
<i>P</i> 值	0.000

注:a,与空白组比较, $P<0.05$;b,与阴性对照组比较, $P<0.05$

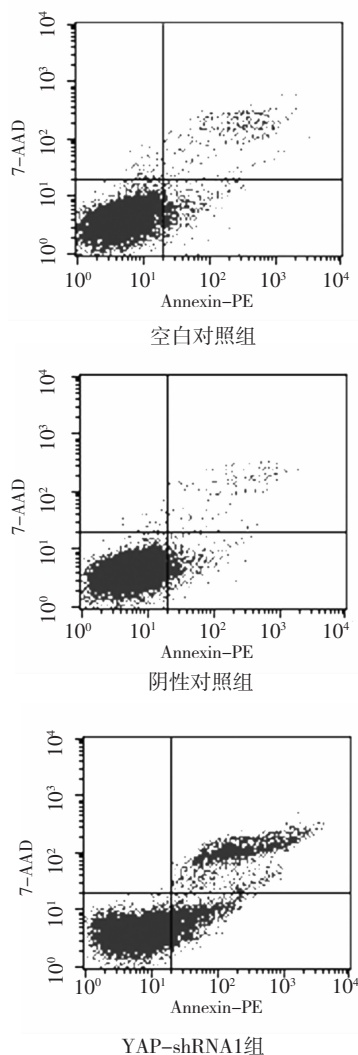


图 6 各组细胞凋亡情况

Fig.6 Apoptosis rate of each group

3 讨论

Hippo-YAP 信号通路在哺乳动物主要包括 Mst1/2、Sav1(WW45)、Lats1/2、Mob1、YAP、TAZ、TEAD1-

4,上游 Mst1/2、Sav1(WW45)、Lats1/2、Mob1 对 Hippo-YAP 信号通路负性调控作用,其中 Lats1/2 可直接使 YAP 发生磷酸化介导 YAP 胞质转位,抑制 Hippo-YAP 信号通路,一旦失去上游控制将导致 YAP 异常活化,引起细胞恶性增殖和转化^[11-13]。研究表明 Hippo-YAP 信号通路异常活化可导致肿瘤发生发展,YAP 在大多数实体肿瘤如肝癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌、皮肤癌、卵巢癌中表达升高则证实了这一结论^[7,11,14]。

YAP 作为此信号通路靶因子,与非受体酪氨酸蛋白激酶家族中 c-Yes 蛋白 SH3 区域结合,分子量约 65 KD 蛋白质,位于人类染色体 11q22 上,包含 WW 结构域、PDZ 相互作用模体、SH3 绑定模体、CC (coiled-coil) 结构域、14-3-3 家族蛋白结合区域,这些结构对 YAP 功能起着重要作用,导致 YAP 没有固有 DNA 结合区域,作为一个转录共调节子,除了与下游 TEAD1-4 结合外,还可与其他 DNA 结合的转录因子相互作用,如与 Smad2/3, Smad7, RUNX1/2, p63/p73, ErbB4 作用,调节不同基因转录水平,控制细胞和组织增殖、分化及器官发育^[12,15],以上 YAP 特殊结构为研究 YAP 与 AR 相互作用提供理论基础,最近研究证实 YAP 可调节转录因子 FoxO1 活性,影响转录因子 KLF5 及其靶基因表达,且 YAP 表达与 ER 和 PR 存在相关性,AR 与上述 KLF5、ER 和 PR 等同为核转录因子,表明 YAP 可能与 AR 存在相互作用^[9,13,16]。

本研究发现 YAP 在前列腺癌组织表达高于癌旁组织,且与前列腺癌分期分级相关^[17]。本课题组在前期研究中还证实 YAP 在表达 AR 的 LNCaP 细胞系高水平表达,故选用此株细胞证实 YAP 在前列腺癌中作用机制,构建 3 条特异性 shRNA 慢病毒干扰载体成功感染 LNCaP 细胞,经过嘌呤霉素筛选,获得了 YAP 基因稳定下调的 LNCaP 细胞,荧光显微镜下观察到感染后细胞表达大量 GFP, YAP-shRNA1、YAP-shRNA2 YAP-shRNA3 各组感染效率达到 95% 以上,real-time PCR 及 Western blot 检测发现各组 LNCaP 细胞中 YAP mRNA 和蛋白表达水平较其对照组显著降低,其中 YAP-shRNA1 效果最为显著。提示 shRNA 慢病毒干扰载体有效抑制 LNCaP 细胞中 YAP 基因的转录与翻译。YAP 基因沉默后, CCK-8 和克隆形成实验发现 LNCaP 细胞增殖被抑

制,FCM 检测发现细胞凋亡明显增加,提示 YAP 基因在前列腺癌的发生、发展中起促进作用。众所周知,AR 信号通路在 PCa 发生发展中扮演关键角色,控制大量基因包括前列腺特异性抗原的表达,调控前列腺癌细胞生长、凋亡、侵袭和转移^[5,18]。本研究发现,shRNA 慢病毒干扰载体降低 YAP mRNA 和蛋白表达水平后,其 AR mRNA 和蛋白表达水平随之降低,LNCaP 细胞出现增殖抑制和凋亡增加,证实 YAP 与 AR 相互作用,调节前列腺癌细胞的增殖与凋亡。

总之,本研究在前列腺癌 LNCaP 细胞中初步证实 YAP 与 AR 相关联,调节前列腺癌细胞增殖和凋亡,可能在前列腺癌发生、发展、转移以及进展为 CRPC 过程中起着关键作用。进一步阐明二者信号通路关系及作用机制,可能为前列腺癌的研究和治疗提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Oudard S.Progress in emerging therapies for advanced prostate cancer[J].Cancer Treat Rev,2013,39(3):275-289.
- [2] Jemal A,Bray F,Center MM,et al. Global Cancer Statistics[J].CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.
- [3] Petrylak DP.Current state of castration-resistant prostate cancer[J].Am J Manag Care,2013,19(18 s1):s358-365.
- [4] Wang Q,Li W,Liu XS,et al.A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth[J].Mol Cell,2007,27(3):380-392.
- [5] Tran C,Ouk S,Clegg NJ,et al.Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer[J].Science,2009,324(5928):787-790.
- [6] Bennett NC,Gardiner RA,Hooper JD,et al.Molecular cell biology of androgen receptor signaling[J].Int J Biochem Cell Biol,2010,42(6):813-827.
- [7] Xie Q,Chen J,Feng H,et al.YAP/TEAD-mediated transcription controls cellular senescence[J].Cancer Res,2013,73(12):3615-3624.
- [8] Johnson R,Halder G.The two faces of Hippo:targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment[J].Nat Rev Drug Discov,2014,13(1):63-79.
- [9] Tufail R,Jorda M,Zhao W,et al.Loss of Yes-associated protein (YAP) expression is associated with estrogen and progesterone receptors negativity in invasive breast carcinomas[J].Breast Cancer Res Treat,2012,131(3):743-750.
- [10] Tanner MJ,Welliver RC Jr,Chen M,et al.Effects of androgen receptor and androgen on gene expression in prostate stromal fibroblasts and paracrine signaling to prostate cancer cells[J].PLoS One,2011,6(1):e16027.
- [11] Zhao B,Lei Q,Guan KL.The Hippo-YAP pathway:new connections between regulation of organ size and cancer[J].Curr Opin Cell Biol,2008,20(6):638-646.
- [12] Yu FX,Guan KL.The Hippo pathway:regulators and regulations[J].Genes Dev,2013,27(4):355-371.
- [13] Shao D,Zhai P,Del Re DP,et al.A functional interaction between Hippo-YAP signalling and FoxO1 mediates the oxidative stress response[J].Nat Commun,2014(5):3315.
- [14] Lamar JM,Stern P,Liu H,et al.The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2012,109(37):E2441-E2450.
- [15] D'Addario I,Abbruzzese C,Lo Iacono M,et al.Overexpression of YAP1 induces immortalization of normal human keratinocytes by blocking clonal evolution[J].Histochem Cell Biol,2010,134(3):265-276.
- [16] Zhi X,Zhao D,Zhou Z,et al.YAP promotes breast cell proliferation and survival partially through stabilizing the KLF5 transcription factor[J].Am J Pathol,2012,180(6):2452-2461.
- [17] 李文宾,王德林,盛夏,等.Yes 相关蛋白在前列腺癌中的表达及意义[J].重庆医科大学学报,2014,39(1):5-8.
- [18] Wang Q,Li W,Zhang Y,et al.Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer[J].Cell,2009,138(2):245-256.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》邮发代号:78-132