

泌尿系统疾病诊断与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000167

shRNA 沉默 YAP 基因对人肾癌 786-O 细胞增殖和凋亡的影响

曹建佳¹, 何江², 李兴森³, 陈柯宏¹, 盛夏¹, 李文宾¹, 李美材¹, 黄彪³, 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. 重庆市綦江区人民医院泌尿外科, 重庆 401420)

【摘要】目的:探讨慢病毒干扰载体沉默 Yes-相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)对人肾癌 786-O 细胞增殖和凋亡的影响。**方法:**用细胞免疫荧光法检测肾癌 786-O 细胞中 YAP 蛋白表达情况;构建针对 YAP 基因的 shRNA 慢病毒干扰载体转染 786-O 细胞。RT-PCR 和 Western blot 分别检测干扰 786-O 细胞前后 YAP mRNA 及蛋白的表达情况;CCK-8(cell counting kit-8)法检测沉默 YAP 后细胞增殖的改变;流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡和周期的变化。**结果:**786-O 细胞中 YAP 蛋白表达于细胞浆和细胞核;shRNA-YAP 慢病毒干扰载体转染 4 d 后,可明显下调 786-O 细胞 YAP mRNA 及蛋白表达水平($P=0.000$),并且明显抑制细胞增殖和促进细胞凋亡($P=0.000$);细胞周期紊乱,G1 期细胞明显增加,S 期细胞明显降低($P=0.000$)。**结论:**YAP-shRNA 慢病毒干扰载体能有效抑制 YAP 基因在 786-O 细胞中表达,进而抑制细胞增殖并促进细胞凋亡。

【关键词】肾细胞癌;Yes-相关蛋白;RNA 干扰;慢病毒**【中图分类号】**R737.11**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-11-27

Influence of YAP gene silencing by shRNA on the proliferation and apoptosis of human renal cancer cell 786-O

Cao Jianjia¹, He Jiang², Li Xingsen³, Chen Kehong¹, Sheng Xia¹,Li Wenbin¹, Li Meicai¹, Huang Biao³, Wang Delin¹

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

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

3. Department of Urinary Surgery, People's Hospital of Qijiang)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of Yes-associated protein(YAP) gene silencing by shRNA on the proliferation and apoptosis of human renal cancer cells 786-O. **Methods:** Expression of YAP protein in 786-O cells was detected by immunofluorescence assay. Lentiviral interference vectors of shRNA-YAP were constructed successfully and were transfected into 786-O cells. Meanwhile blank control group and negative control group were divided. Expression of YAP mRNA and protein in 786-O cells was detected by RT-PCR and Western blot, respectively. CCK-8(cell counting kit-8) assay was applied to examine the effect of YAP silencing on the proliferation in 786-O cells. Apoptosis and cell cycle of 786-O cells were examined by flow cytometry. **Results:** YAP protein was expressed in cytoplasm and nucleus of 786-O cells. On 4 d after shRNA-YAP lentiviral interference vectors being infected, expression of YAP mRNA and protein in 786-O cells was significantly reduced($P=0.000$), cell proliferation was inhibited, and apoptosis was increased significantly($P=0.000$). YAP silencing resulted in cell cycle distribution disorder in 786-O cells, which the number of G1 phase cells was significantly increased while the number of S phase cells was significantly decreased compared with that of blank control group and negative control group($P=0.000$). **Conclusion:** shRNA-YAP lentiviral interference vectors can effectively decrease YAP gene expression in 786-O cells, inhibit cell proliferation and promote cell apoptosis.

【Key words】renal cell cancer; Yes-associated protein(YAP); RNA interference; lentivirus

作者介绍: 曹建佳, Email: deancaocool@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: cqnc2012jja1698); 重庆市卫生局基金资助项目(编号: 2013-2-082)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000167.html>

肾细胞癌(renal cell cancer,RCC)是泌尿系致死率最高的恶性肿瘤,占肾脏恶性肿瘤 90%,每年全球约有 100 000 例 RCC 患者因此死亡,其发生机制迄今不甚清楚^[1]。RCC 治疗仍靠外科手术,晚期治疗非常棘手,随着对肿瘤发病机制研究不断深入,基因靶向治疗已取得了令人瞩目的进步^[1-2]。

Yes 相关蛋白(Yes-associated protein,YAP)是一种连接蛋白和转录共激活因子,为 Hippo-YAP 通路的下游核心因子。Hippo-YAP 信号传导通路通过一系列激酶级联反应调控 YAP、促进细胞增殖和抑制凋亡、达到细胞和组织的异常扩增、导致肿瘤发生^[3]。YAP 蛋白高表达促进肿瘤(如肺癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌等)的形成,有研究表明 YAP 与许多肿瘤的生长、侵袭、转移等密切相关,在肿瘤的发生、发展中发挥着重要的作用^[4]。本实验拟观察慢病毒介导的 YAP 基因干扰对人 RCC 细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人肾癌细胞株 786-O 购自 ATCC。PRMI1640 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司;Trizol 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、TaqDNA 聚合酶购自 TAKARA 公司;蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体、电化学发光试剂盒(ECL)购自上海碧云天生物技术有限公司;YAP 兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz 生物技术公司);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记的山羊抗兔荧光二抗(北京康为世纪公司);CCK-8 试剂盒(Sigma 公司);琼脂糖(SABC 公司进口分装)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 786-O 细胞用含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液,于 37℃、5%CO₂ 孵育箱中培养,待细胞密度长至 80%~90%时,用 0.125%胰酶将贴壁生长的细胞在 37℃消化 1~2 min 后,传代培养。

1.2.2 免疫荧光法检测 786-O 细胞中 YAP 蛋白的表达 取对数生长期的 786-O 细胞,接种于预先放置在 6 孔板中的盖玻片上,待细胞在盖玻片上密度长至约 90%时,室温下 4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 清洗 3 次,0.3% TritonX-100 破膜 10 min,山羊血清封闭 30 min,加 1:200 稀释的兔抗人 YAP 抗体,4℃过夜,再加入荧光二抗(1:50 稀释),37℃避光孵育 30 min,DAPI 染色 5 min,甘油封片后荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 慢病毒干扰载体的构建 根据 GenBank 中人 YAP (NM-006106)基因信息,设计针对 YAP 基因的特异性 shRNA 序列(表 1),并以 pMAGIC7.1 为载体,包装成 3 条 YAP-shRNA 和 1 条阴性对照 shRNA(negative control shRNA,NC-shRNA)慢病毒重组质粒载体[均含绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)]。慢病毒干扰载体由上海生博生物医药科技有限公司合成并包装,并进行测序鉴定和病毒滴度的测定。

1.2.4 786-O 细胞感染所需病毒量和转染效率的确定 取对数生长期细胞接种 96 孔板,待细胞生长贴壁后,用 NC-shRNA 阴性对照病毒感染细胞。设置 3 组感染复数(multiplicity of infection,MOI)为 1、20、100,对应的病毒数量为 1×10^4 、 2×10^5 TU 和 1×10^6 TU。37℃、5%CO₂ 孵育箱中培养,96 h 后于荧光显微镜下随机选取视野计数,转染效率=(荧光视野下的细胞数/普通光视野下的细胞数)×100%,根据转染效率确定最佳感染 786-O 细胞的 MOI 值。

感染前 1 d,786-O 细胞接种 6 孔板,待细胞融合度达到 30%~50%。设 ShYAP-1、ShYAP-2、ShYAP-3 3 个实验组,分别加入 3 种 shRNA 慢病毒感染,使每孔的 MOI=20,并同时设立空白对照组和阴性对照组。感染 96 h 后荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。

1.2.5 RT-PCR 检测慢病毒转染 786-O 后细胞对 YAP 基因 mRNA 的表达 收集上述 3 个实验组和对照组共 5 组细胞,按照 Trizol 试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA,Thermo NANO DROP 2000 分光光度计检测 RNA 浓度和纯度,取 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA,进行 PCR 扩增,每个样本重复 3 次。YAP mRNA 上游引物序列为:5'-TGAACAAACGTCCA-GCAAGATAC-3',下游引物序列:5'-CAGCCCCCAAATG-AACAGTAG-3',165 bp。内参照选用 GAPDH,上游:5'-ACC-ACCATGGAGAAGGCTGG-3',下游:5'-CTCAGTGTAGCCC-

表 1 3 对干扰序列及 1 对阴性对照 shRNA 序列

Tab.1 Three pairs of interference sequences and one pair of negative control shRNA

基因	序列
ShYAP-1	正义链:5'-CCGGGCTCATTCTCTCCAGCTTCTCAAGAGAAAGCTGGAGAGGAATGAGCTTTTTTG-3' 反义链:5'-AATTCAAAAAAGCTCATTCTCTCCAGCTTCTCTTGAAGAGCTGGAGAGGAATGAGC-3'
ShYAP-2	正义链:5'-CCGGCCTTAACAGTGGCACCATTCTCAAGAGAATAGGTGCCACTGTTAAGGTTTTTG-3' 反义链:5'-AATTCAAAAAACCTTAACAGTGGCACCATTCTCTTGAATAGGTGCCACTGTTAAGG-3'
ShYAP-3	正义链:5'-CCGGCCGTTTCCAGACTACCTTCTCAAGAGAAAGGTAGTCTGGGAAACGGTTTTTG-3' 反义链:5'-AATTCAAAAAACCGTTTCCAGACTACCTTCTCTTGAAGAGTGTCTGGGAAACGG-3'
NC-shRNA	正义链:5'-CCGGTCTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTG-3' 反义链:5'-AATTCAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTGAACGTGACACGTTCCGAGAA-3'

AGGATGC-3', 528 bp^[5]。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环后, 72 °C 终末延伸 5 min。PCR 产物于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, Quantity One 软件照相并定量分析。以 YAP/GAPDH (灰度值的比值) 代表 YAP mRNA 相对表达水平, YAP mRNA 表达抑制率 (%) = (1 - 实验组/阴性对照组) × 100%。

1.2.6 Western blot 检测 786-O 细胞中 YAP 基因的表达 收集同样经过处理 96 h 的 5 组细胞, RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白每孔上样量 50 μg, 经 10% 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 80 V 电压下分离, 250 mA 恒流将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。加入兔抗人 YAP 一抗 (1:200) 过夜后, TBST 洗膜, 加山羊抗兔 IgG (1:5 000) 孵育 1 h, 最后经 TBST 充分漂洗后, ECL 化学发光显影, Quantity One 软件对条带的光密度值作分析。以 YAP/β-actin (灰度值的比值) 代表 YAP 蛋白相对表达水平, YAP 蛋白表达抑制率 (%) = (1 - 实验组/阴性对照组) × 100%。

1.2.7 CCK-8 检测细胞增殖能力的改变 将上述取得最佳沉默效果的 ShYAP-3 干扰载体组, NC-shRNA 组转染 786-O 细胞, 细胞制备为 5×10^4 个/ml 的单细胞悬液, 每孔 100 μl, 接种到 96 孔板, 每组设 3 个复孔, 同时设空白对照组。将 96 孔板置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中, 细胞分别孵育 48、96、144 h。然后每孔加入 10 μl CCK-8, CO₂ 培养箱中继续孵育 1~2 h, 用酶标仪测出 450 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值, 计算细胞增殖抑制率 = (空白对照孔 A 值 - 实验孔 A 值) / 空白对照孔 A 值 × 100%。实验重复 3 次。

1.2.8 细胞周期及凋亡检测 同 1.2.7 取 ShYAP-3 干扰载体组, NC-shRNA 组转染 786-O 细胞, 并同时设空白对照组。96 h 后, 各组细胞用 0.125% 胰酶消化, PBS 清洗 2 次, 离心去上清后上流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。另外 3 组细胞经 70% 乙醇固定过夜后, 上流式细胞仪分析各组细胞的细胞周期。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件, 实验结果以均数 ± 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

2.1 786-O 细胞中 YAP 蛋白的表达

细胞免疫荧光法检测发现肾癌 786-O 细胞中有大量的绿色荧光出现 (图 1A); 为 786-O 细胞经 DAPI 染色后的细胞核染色相 (图 1B); 通过将绿色荧光与核染色相融合后, 可见荧光表达在细胞浆和细胞核中 (图 1C); 表明 YAP 蛋白在 786-O 细胞的细胞浆和细胞核都存在着广泛表达。

2.2 肾癌 786-O 细胞慢病毒感染所需 MOI 测定与最佳 MOI 选择

NC-shRNA 慢病毒转染 786-O 细胞 96 h 后, 随机选取视野计算出 786-O 细胞的慢病毒感染效率, 对同一视野进行明视野和荧光视野拍照 (图 2)。病毒 MOI=1 时, 转染率 < 5%;

MOI=100 时, 转染率 > 95%; MOI=20 时, 转染率 > 90%, 且添加增强剂后, 转染效率更高。但 MOI=100 时, 细胞死亡较多, 细胞密度明显减小, 并且病毒工作液的消耗量大, 故选择 786-O 细胞的最佳 MOI=20。

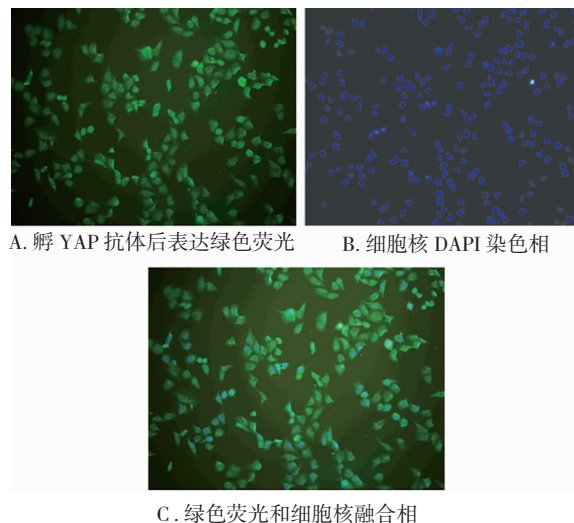


图 1 细胞免疫荧光法检测肾癌 786-O 细胞中 YAP 的表达情况 (200 ×)

Fig.1 Expression of YAP protein in renal cancer 786-O cells detected by immunofluorescence (200 ×)

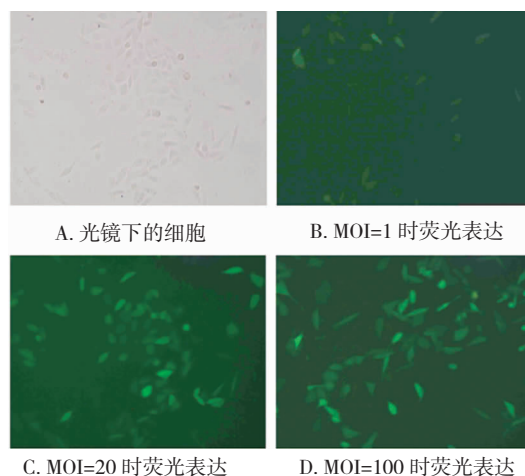


图 2 荧光显微镜观察 786-O 细胞不同 MOI 值 GFP 的表达情况 (200 ×)

Fig.2 Expression of GFP of 786-O cells with different MOI values under fluorescence microscope (200 ×)

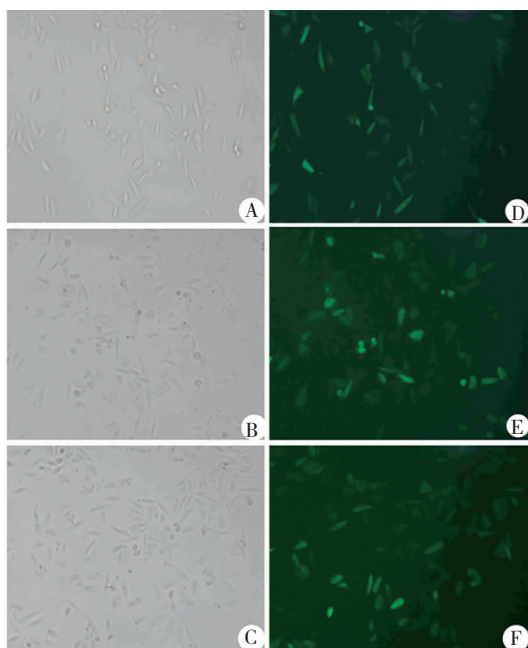
2.3 转染效率观察

3 对实验组 shRNA 慢病毒转染 786-O 细胞 96 h 后, 通过正置荧光显微镜观察到各组均有绿色荧光蛋白表达, 提示均转染成功。ShYAP-1、ShYAP-2 和 ShYAP-3 组转染效率都超过 80%, 其中 ShYAP-3 组转染率最高, 达到 90% (图 3)。

2.4 shRNA 慢病毒对 786-O 细胞 YAP mRNA 表达的影响

3 个实验组 ShYAP-1、ShYAP-2 和 ShYAP-3 组 YAP mRNA 表达水平分别为 0.297 ± 0.023 , 0.437 ± 0.025 , 0.273 ± 0.006 , 与阴性对照组 (0.830 ± 0.020) 及空白对照组 ($0.858 \pm$

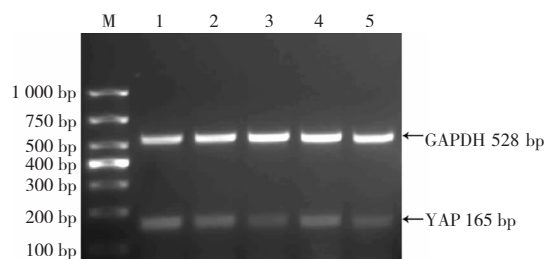
0.007)相比 YAP mRNA 明显降低($P<0.05$)(图 4、表 2),其抑制效率为:ShYAP-1 为 64.3%,ShYAP-2 为 47.4%,ShYAP-3 为 67.1%,而阴性对照组与空白对照组 YAP mRNA 相对表达量无明显差异($P=0.093$)。



A~C. 光学显微镜;D~F. 荧光显微镜

图 3 786-O 细胞中慢病毒感染效率 (200 ×)

Fig.3 Lentiviral infection efficiency of 786-O cells (200 ×)



M. DNA Marker;1. 空白对照组;2. 阴性对照组;3. ShYAP-1;
4. ShYAP-2;5. ShYAP-3

图 4 各组 786-O 细胞中 YAP mRNA 的表达

Fig.4 Expression of YAP mRNA of 786-O cells in each group

表 2 各组 YAP mRNA 的相对表达水平 ($\%, \bar{x} \pm s, n=5$)

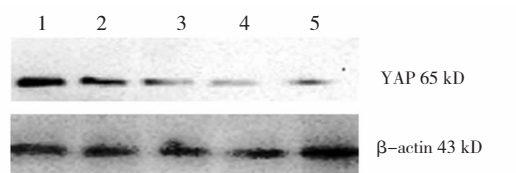
Tab.2 Relative expression of YAP mRNA in each group
($\%, \bar{x} \pm s, n=5$)

分组	YAP	P_a 值	P_b 值
空白对照组	0.858 ± 0.007	/	0.093
阴性对照组	0.830 ± 0.020	0.093	/
ShYAP-1组	0.297 ± 0.023	0.000	0.000
ShYAP-2组	0.437 ± 0.025	0.000	0.000
ShYAP-3组	0.273 ± 0.006	0.000	0.000
F 值	743.673		
P 值	0.000		

注: P_a 值,与空白对照组比较; P_b 值,与阴性对照组比较;/,无对应值

2.5 shRNA 慢病毒对 786-O 细胞 YAP 蛋白表达的影响

实验组 ShYAP-1、ShYAP-2 和 ShYAP-3 组 YAP 蛋白表达量分别为 0.323 ± 0.006 、 0.357 ± 0.021 、 0.193 ± 0.015 ,较空白对照组(0.903 ± 0.015)和阴性对照组(0.883 ± 0.012)有明显减弱($P<0.05$)(图 5、表 3),蛋白表达抑制效率 ShYAP-1 为 63.4%,ShYAP-2 为 59.6%,ShYAP-3 为 78.1%。而阴性对照组与空白对照组 YAP 蛋白表达量无明显差异($P=0.124$),结果表明实验组 shRNA 慢病毒有效抑制了 YAP 蛋白的表达,综上结果表明 ShYAP-3 组慢病毒干扰载体的抑制效率最高。



1. 空白对照组;2. 阴性对照组;3. ShYAP-1;
4. ShYAP-2;5. ShYAP-3

图 5 各组 786-O 细胞中 YAP 蛋白的表达

Fig.5 Expression of YAP protein in 786-O cells of each group

表 3 各组 YAP 蛋白的相对表达水平 ($\%, \bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.3 Relative expression of YAP protein in each group
($\%, \bar{x} \pm s, n=5$)

分组	YAP	P_a 值	P_b 值
空白对照组	0.903 ± 0.015	/	0.124
阴性对照组	0.883 ± 0.012	0.124	/
ShYAP-1组	0.323 ± 0.006	0.000	0.000
ShYAP-2组	0.357 ± 0.021	0.000	0.000
ShYAP-3组	0.193 ± 0.015	0.000	0.000
F 值	1 583.094		
P 值	0.000		

注: P_a 值,与空白对照组比较; P_b 值,与阴性对照组比较;/,无对应值

2.6 CCK-8 检测细胞增殖能力的改变

ShYAP-3 组 786-O 细胞在培养 48、96、144 h 后,细胞吸光度值较对照组明显减小($P<0.05$),而空白对照组和阴性对照组间无显著差异($P>0.05$)(表 4)。这表明 ShYAP-3 组细胞生长较对照组细胞生长速度减慢,并且病毒感染 144 h 后这种生长抑制持续存在,进一步说明 shRNA 干扰慢病毒抑制 YAP 在肾癌 786-O 细胞表达后,持续有效抑制细胞增殖。

2.7 FCM 检测细胞凋亡的改变

ShYAP-3 组、空白对照组、阴性对照组 786-O 细胞凋亡率分别为 $(21.97 \pm 1.39)\%$ 、 $(4.18 \pm 0.13)\%$ 、 $(3.79 \pm 0.23)\%$ 。ShYAP-3 组与对照组凋亡率差异有统计学意义(ShYAP-3 组 vs. 空白对照组: $P=0.000$;ShYAP-3 组 vs. 阴性对照组: $P=0.000$),阴性对照组和空白对照组凋亡率相比无明显差异($P=0.582$)(图 6)。

2.8 FCM 检测细胞周期的改变

ShYAP-3 组与对照组周期比较,G1 期明显增多,而 S 期

表 4 各组细胞的 A 值和增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)						
Tab.4 Absorbance value and inhibitory rate of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)						
分组	$A_{450\text{nm}}$			增殖抑制率(%)		
	48 h	96 h	144 h	48 h	96 h	144 h
空白对照组	0.900 $\pm$ 0.060	0.903 $\pm$ 0.045	0.903 $\pm$ 0.038	0.00	0.00	0.00
阴性对照组	0.887 $\pm$ 0.060	0.880 $\pm$ 0.026	0.883 $\pm$ 0.025	1.44	2.55	2.21
shYAP-3组	0.780 $\pm$ 0.040 ^{ab}	0.530 $\pm$ 0.026 ^{ab}	0.370 $\pm$ 0.026 ^{ab}	13.33 ^{ab}	41.31 ^{ab}	59.03 ^{ab}
F 值	4.408	114.650	297.301			
P 值	0.066	0.000	0.000			

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

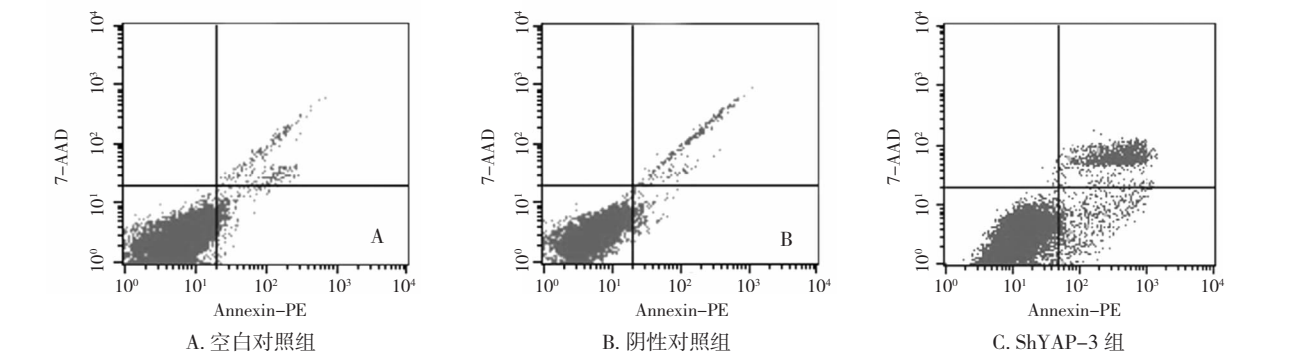


图 6 各组细胞凋亡率比较
Fig.6 Apoptosis rate of each group

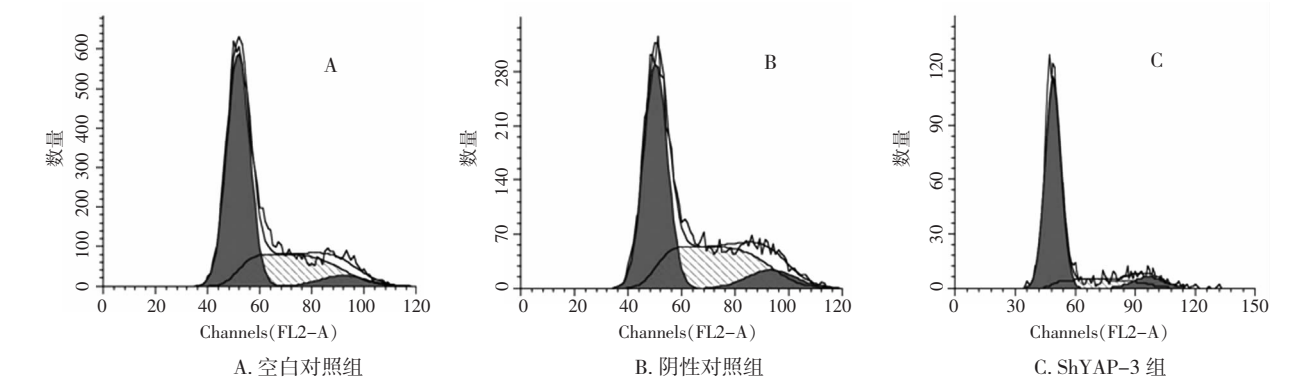


图 7 各组细胞周期分布图
Fig.7 Cell cycle distribution of each group

则明显减少($P<0.05$)(图 7、表 5),提示 YAP-shRNA 干扰慢病毒载体有效地将 786-O 细胞阻滞于 G1 期,抑制细胞增殖。

表 5 各组 786-O 细胞的细胞周期分布 (%, $\bar{x} \pm s, n=3$)		
Tab.5 Cell cycle distribution of 786-O cells in each group (%, $\bar{x} \pm s, n=3$)		
分组	G1 期	S 期
空白对照组	54.58 $\pm$ 2.60	39.23 $\pm$ 1.69
阴性对照组	53.00 $\pm$ 2.65	38.41 $\pm$ 1.05
ShYAP-3	77.67 $\pm$ 1.16 ^{ab}	14.36 $\pm$ 0.82 ^{ab}
F 值	113.688	387.663
P 值	0.000	0.000

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

3 讨论

Hippo-YAP 是一个新近发现的信号转导通路,在调控细胞生长、增殖及器官大小等方面起着重要作用。在哺乳动物体内,Hippo-YAP 信号通路包括 Mst1/2、LATS1/2、YAP、TAZ 和 TEAD 等,Mst1/2、LATS1/2 等转录因子位于 YAP 上游,为肿瘤抑制因子^[6];TEAD 是位于 YAP 下游转录因子,YAP 通过与 TEAD 相互结合发挥作用^[7]。Hippo-YAP 信号通路一旦失调,将会导致 YAP 异常激活,从而促进肿瘤发生和进展^[8]。YAP 是果蝇 Yorkie 蛋白在哺乳动物中

同源的蛋白,为分子量约 65 kD 的蛋白质^[9]。人类 YAP 基因位于染色体 11q22 上,蛋白则广泛表达于机体各组织中,YAP 能与多种蛋白相互作用并参与细胞内的多种信号转导通路,YAP 活性增加,导致下游转录因子表达增加,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡^[10-11]。研究表明 YAP mRNA 和蛋白在许多肿瘤中都高表达,YAP 与肿瘤细胞迁移和侵袭性相关^[4,7,11]。本研究初步证实肾癌组织中 YAP mRNA 比癌旁组织明显增高,且 YAP 基因表达水平与肾癌分化程度和临床分期密切相关^[5]。

Diep 等^[12]研究 RNA 干扰 YAP 基因后显著抑制胰腺癌细胞增殖,Orr 等^[13]以慢病毒介导 YAP 沉默对人胶质瘤细胞增殖与生长特性的影响,发现慢病毒介导的 RNA 干扰沉默可以抑制胶质瘤细胞生长,证实慢病毒 RNA 干扰技术有效沉默 YAP 基因。RNA 干扰效率依赖于转染效率的提高及载体系统的优化,慢病毒载体具有转染效率高、转移基因片段容量大、免疫反应低、安全性好、可感染分裂细胞等优点,并且可将外源性基因有效整合到靶细胞基因组,从而达到长期稳定表达^[14]。慢病毒载体普遍运用于 RNA 干扰技术中,成为基因功能研究和基因治疗方面的一种有力手段^[15]。

本实验首先利用免疫荧光技术证实人肾癌 786-O 细胞中 YAP 蛋白的表达,进一步研究沉默 YAP 表达对肾癌细胞的增殖和凋亡的影响。本研究前期构建了特异性沉默 YAP 的质粒载体,采用脂质体介导方法转染 786-O 细胞,但是转染效率很低,YAP 基因沉默效果极差。再次构建了 3 条特异性的 shRNA 并包装成慢病毒干扰载体,成功转染 786-O 细胞,荧光显微镜下观察到目的细胞中 GFP 大量表达,根据转染效率和对细胞的毒副作用,以及病毒工作液的消耗量选择了 786-O 细胞的最佳感染 MOI 值为 20。ShYAP-1、ShYAP-2、ShYAP-3 在 MOI 等于 20 时转染效率都超过 80%,并且 YAP 基因在 mRNA 和蛋白水平均有明显抑制,其中 ShYAP-3 组对 YAP 基因沉默效果最高,验证了慢病毒载体良好的干扰效果。CCK-8 法发现 shRNA 慢病毒干扰载体沉默 YAP 后有效抑制 786-O 细胞增殖,FCM 发现细胞周期阻滞在 G1 期,细胞凋亡明显增加,其机制为 YAP-shRNA 慢病毒干扰载体通过抑制 YAP 基因在 786-O 细胞中表达,细胞周期阻滞在 G1 期,进而抑制细胞增殖并促进细胞凋亡。YAP 基因对肾

癌细胞增殖和凋亡影响的详细作用机制是什么?还可能通过其他信号通路促进肾癌的发展?将在后期实验中进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Vasudev NS, Selby PJ, Banks RE. Renal cancer biomarkers: the promise of personalized care[J]. BMC Med, 2012, 10: 112.
- [2] Rathmell WK, Godley PA. Recent updates in renal cell carcinoma[J]. Curr Opin Oncol, 2010, 22(3): 250-256.
- [3] Hilman D, Gat U. The evolutionary history of YAP and the hippo/YAP pathway[J]. Mol Biol Evo, 2011, 28(8): 2403-2417.
- [4] Chan SW, Lim CJ, Chen L, et al. The Hippo pathway in biological control and cancer development[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(4): 928-939.
- [5] 赵修民, 王德林, 马强. Yes-相关蛋白和大肿瘤抑制基因 1 在肾透明细胞癌中的表达及意义[J]. 中华泌尿外科杂志, 2012, 33(3): 171-175.
- [6] 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.
- [7] 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 USA, 2012, 109(37): E2441-2450.
- [8] Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(8): 877-883.
- [9] 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.
- [10] Zhao B, Li L, Wang L, et al. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis[J]. Genes Dev, 2012, 26(1): 54-68.
- [11] Zhang J, Ji JY, Yu M, et al. YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(12): 1444-1450.
- [12] Diep CH, Zucker KM, Hostetter G, et al. Down-regulation of Yes associated protein 1 expression reduces cell proliferation and clonogenicity of pancreatic cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32783.
- [13] Orr BA, Bai H, Odia Y, et al. Yes-associated protein 1 is widely expressed in human brain tumors and promotes glioblastoma growth[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2011, 70(7): 568-577.
- [14] Santamaria J, Khalfallah O, Sauty C, et al. Silencing of choline acetyltransferase expression by lentivirus-mediated RNA interference in cultured cells and in the adult rodent brain[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(2): 532-544.
- [15] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational[J]. Biochem J, 2012, 443(3): 603-618.

(责任编辑:冉明会)