

• 短篇论著 •

YAP1 在食管癌中的表达及其对体外食管癌细胞培养化疗敏感性的影响

张友明, 姚 杰[△]

(安徽省池州市人民医院胸心外科, 安徽池州 247100)

摘要:目的 探讨 Yes 相关蛋白 1(YAP1)在食管癌中的表达及意义,以及对体外细胞化疗敏感性的影响。方法 选取 2016 年 1 月至 2019 年 2 月该院 89 例食管癌患者为研究对象,食管癌组织标本纳入食管癌组,癌旁组织纳入癌旁组织组,采用免疫组织化学染色法检测 YAP1 蛋白表达,采用噻唑蓝(MTT)检测试剂检测食管癌细胞对羟基喜树碱(HCPT)、顺铂(CDDP)、丝裂霉素(MMC)等的体外敏感性。结果 食管癌 YAP1 蛋白阳性表达率为 69.66%,明显高于癌旁组织(16.85%),差异有统计学意义($P < 0.05$);TNM 分期Ⅲ期、中-低分化、有淋巴结转移患者 YAP1 蛋白阳性表达率分别为 94.44%、76.47%和 95.45%,明显高于 TNM 分期Ⅰ~Ⅱ期、高分化、无淋巴结转移患者(63.38%、47.62%、61.19%),差异有统计学意义($P < 0.05$);YAP1 阳性表达患者对 HCPT、CDDP 和 MMC 的敏感率分别为 56.45%、30.65%和 45.16%,明显低于 YAP1 阴性表达患者(88.89%、66.67%、77.78%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 食管癌中 YAP1 蛋白明显升高,与 TNM 分期、分化程度及淋巴结转移关系密切,且对食管癌细胞体外化疗敏感性有一定影响。

关键词: Yes 相关蛋白 1; 食管癌; 临床病理特征; 化疗

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.22.029

中图法分类号: R446.9; R735.1

文章编号: 1673-4130(2020)22-2808-03

文献标识码: B

食管癌是我国高发的消化道肿瘤之一,每年食管癌死亡患者高达 15 万人^[1]。本病好发于 40 岁以上人群,男性患者多于女性,其典型症状以进行性吞咽困难为主,晚期患者还可能出现胸背疼痛,以及气管、支气管、肝、脑等脏器转移情况^[2]。Yes 相关蛋白 1(YAP1)是新近发现的抑癌路径 Hippo 的重要调控因子。临床研究显示,YAP1 在胃癌、非小细胞癌等多种肿瘤细胞中存在过度表达情况,提示高度活化的 YAP1 可能与胃癌、非小细胞癌等肿瘤疾病发生、发展有关^[3]。但 YAP1 在食管癌中的表达及意义,以及对体外细胞培养化疗敏感性的影响如何,临床研究较少。为此,本研究选取本院保存的 89 例食管癌患者标本进行了分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2019 年 2 月本院 89 例食管癌患者为研究对象,其中男 49 例,女 40 例;≤60 岁患者 41 例,≥60 岁患者 48 例;食道中段 18 例,食道中段 43 例,食道下段 28 例。纳入标准:(1)均经病理学检查确诊;(2)临床病历资料完整;(3)术前未行放化疗。排除标准:(1)合并有其他系统恶性肿瘤;(2)有免疫系统疾病。食管癌患者的癌组织标本 89 份纳入食管癌组,癌旁组织(距癌边缘>5 cm,病理结果确认无癌细胞)标本 89 份纳入癌旁组织组。

1.2 免疫组织化学染色 两组标本进行石蜡切片,

并行常规脱蜡至水,选用北京中杉金桥生物技术有限公司提供的 PV-600 免疫组织化学试剂盒进行免疫组织化学检测,所有操作根据说明书进行,将滴入 YAP1 抗体的标本 4℃ 冷藏过夜后,选用 DAB 进行显色,而后选用苏木素复染,并于显微镜下观察最终结果。

1.3 体外药敏试验 将食管癌标本研磨碾碎,并滴加培养液,收集细胞悬液后于 4 500 r/min,5 cm 半径条件下离心 15 min,沉淀后加入培养液反复吹打,最终获取肿瘤单细胞悬液,选用小牛血清对标本进行培养,并制备成细胞浓度为 5×10^4 的细胞悬液,随后将其接种至 96 孔板内。设置羟基喜树碱(HCPT)组、顺铂(CDDP)组、丝裂霉素(MMC)组、氟尿嘧啶(5-FU)组、阿霉素(ADM)组及 5 个对照组,将 15 μL 0.5 ng/mL 抗肿瘤药物滴入孔板内,于室温下,10% CO₂ 的温箱内培养 24 h,取出后滴入 15 μL 噻唑蓝(MTT)检测试剂,15 μL 不完全培养液,静置反应 3 h,4 000 r/min 离心后,每孔滴入 15 μL 二甲基亚砷(DMSO),反应 8 min,选用南京德铁实验设备有限公司生产的 HBS-1096C 自动酶标仪检测每孔 578 nm 波长时的吸光度值,试验共重复 2 次,肿瘤细胞存活率取均值作为最终结果。

1.4 判断标准 (1)免疫组织化学染色结果判断:在高倍镜下随机观察 10 个视野,每个视野计数 100 个细胞,其中染色强度记分如下,无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性细胞比

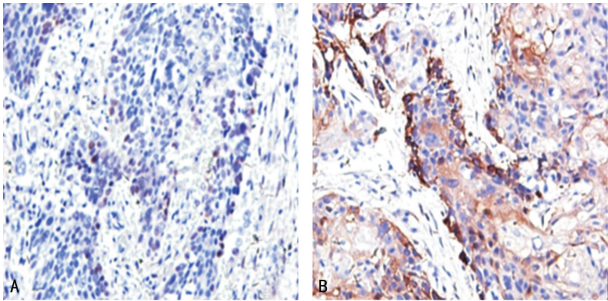
[△] 通信作者, E-mail: buything8888@sina.com。

例<11%为 1 分,11%~<51%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分。染色强度与阳性细胞比例得分之积≥3 分为阳性表达。(2)化疗敏感性:肿瘤细胞存活率≤50%为敏感,而>50%为不敏感。

1.5 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析,计数资料以例数或百分率表示,采用配对 χ^2 检验进行比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 食管癌组与癌旁组织组 YAP1 蛋白表达 食管癌组与癌旁组织组 YAP1 蛋白阳性表达率分别为 69.66%(62/89)、16.85%(15/89),食管癌组 YAP1 蛋白阳性表达率明显高于癌旁组织组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。



注:A 为癌旁组织;B 为食管癌组织。

图 1 免疫组织化学染色图(×200)

2.2 YAP1 蛋白表达与临床病理特征关系 TNM 分期Ⅲ期、中-低分化、有淋巴结转移患者 YAP1 蛋白

阳性表达率明显高于 TNM 分期Ⅰ~Ⅱ期、高分化、无淋巴结转移患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 YAP1 蛋白表达与临床病理特征关系				
临床病理特征	n	YAP1 蛋白阳性表达率	χ^2	P
年龄(岁)				
<60	41	31(75.61)	1.272	0.259
≥60	48	31(64.58)		
性别				
男	49	35(71.43)	0.161	0.688
女	40	27(67.50)		
肿瘤部位				
食道上段	18	13(72.22)	0.197	0.606
食道中段	43	29(67.44)		
食道下段	28	20(71.43)		
TNM 分期				
Ⅰ~Ⅱ期	71	45(63.38)	6.557	0.010
Ⅲ期	18	17(94.44)		
分化程度				
高分化	21	10(47.62)	6.320	0.012
中-低分化	68	52(76.47)		
淋巴结转移				
有	22	21(95.45)	9.199	0.002
无	67	41(61.19)		

2.3 体外化疗敏感性比较 YAP1 阳性表达患者 HCPT、CDDP、MMC 敏感率分别为 56.45%、30.65%和 45.16%,明显低于 YAP1 阴性表达患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 YAP1 阳性表达与阴性表达患者体外化疗敏感性比较[n(%)]

YAP1 表达	n	5-FU	HCPT	CDDP	MMC	ADM
YAP1 阳性表达	62	2(3.23)	35(56.45)	19(30.65)	28(45.16)	4(6.45)
YAP1 阴性表达	27	2(7.41)	24(88.89)	18(66.67)	21(77.78)	3(11.11)
χ^2		0.102	8.856	10.048	8.087	0.104
P		0.750	0.003	0.002	0.004	0.747

3 讨 论

Hippo 信号路径是近年发现的一组信号转导路径,其上游主要由调节分子 Ex、Kibra 等组成,核心分子则以 Mst1/2、Mob1 及 Lats1/2 等为主,效应分子则由 YAP1/TAZ 构成^[4-5]。Hippo 信号路径活化时,效应分子表达水平将被抑制,其与细胞核的结合能力也将损伤,并因此失去转录辅助因子功能,导致细胞周期蛋白 D1、结缔组织生长因子等与增殖相关基因的表达能力被阻断,细胞增殖受限;同时还可抑制 DI-PA1 等与凋亡相关基因的表达,并加速细胞凋亡^[6-7]。而当 Hippo 信号路径失活时,效应分子 YAP1/TAZ 表达率将大幅增加,并进入细胞核诱导细胞增殖,同时抑制其凋亡,导致细胞恶性化^[8]。未分化的干细胞内存在大量未磷酸化的 YAP1,这些 YAP1 将介导

Hippo 信号路径,并对干细胞的自我更新及增殖过程进行调节,最终影响组织器官的生长发育^[9]。YAP1 活性还可受 Catenin 蛋白调控,而 Catenin 蛋白同样与肿瘤发生、发展密切相关,Catenin 蛋白具有促细胞黏附,抑制细胞侵袭和转移等功能。大量研究表明,恶性肿瘤细胞内的 Catenin 蛋白表达明显降低^[10-11]。有研究发现,敲除 YAP1 基因后,干细胞含有的高迁移率族盒蛋白 2 及 Oct4 基因表达水平将大幅下降,甚至消失,而 YAP1 过度表达将诱使多能干细胞编程效率提升 2 倍^[12]。本研究中,食管癌 YAP1 蛋白阳性表达率为 69.66%,明显高于癌旁组织,表明 YAP1 蛋白异常表达与食管癌密切相关。还有研究发现,食管癌及食管不典型增生患者病灶组织内可见 YAP1 同时表达于细胞质及细胞核内,该研究认为慢性炎症反

应癌变过程中, YAP1 的高表达可能参与炎症性疾病的恶性化, 这也可能是 YAP1 参与恶性肿瘤发生的又一机制^[13]。另外, 有研究发现, 宫颈鳞癌病灶组织内 YAP1 表达率明显上升, 高于健康组织, 并且其表达率与患者疾病分化程度、淋巴结转移及复发与否有关^[14]。本研究中, TNM 分期Ⅲ期、中-低分化、有淋巴结转移患者 YAP1 蛋白阳性表达率明显高于 TNM 分期Ⅰ~Ⅱ期、高分化、无淋巴结转移患者, 这与前述研究结果相似, 提示 YAP1 与肿瘤疾病分期、分化程度、是否有淋巴结转移密切相关。

手术联合辅助化疗是多种恶性肿瘤的常用治疗方案, 但多数肿瘤患者存在先天性或获得性放化疗耐药情况^[15]。因此, 有效地评估肿瘤患者药物敏感性对食管癌的治疗具有重要意义。本研究中, YAP1 阳性表达患者对 HCPT、CDDP 和 MMC 的敏感率分别为 56.45%、30.65% 和 45.16%, 明显低于 YAP1 阴性表达患者, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 YAP1 阳性表达和阴性表达患者对 5-FU 和 ADM 的敏感率比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。通过对以上结果分析, 可以发现 YAP1 阳性表达可降低食管癌患者对 HCPT、CDDP 和 MMC 的药物敏感性, 但对 5-FU 和 ADM 敏感性无明显影响, 临床需酌情选用 5-FU 和 ADM 来治疗 YAP1 阳性表达的食管癌患者。

本研究结果发现, 食管癌组织内的 YAP1 蛋白阳性表达率明显升高, 并与 TNM 分期、分化程度及淋巴结转移关系密切, 同时还对患者化疗药物敏感性存在一定影响, 临床可通过检测 YAP1 来评估食管癌 TNM 分期、分化程度及是否有淋巴结转移, 并提示患者对化疗药物的不同敏感性。但由于本组研究纳入样本量小, 需要进一步扩大样本量进行研究。

参考文献

- [1] 乔炎炎, 康南, 李章富, 等. YB-1 蛋白对食管癌细胞恶性表型的影响[J]. 医学研究杂志, 2018, 47(5): 23-27.
- [2] 徐岗, 邵中夫, 黄中, 等. 癌基因 YAP1 在食管鳞癌组织中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(3): 379-381.
- [3] 黄晓峰, 张翔, 宋举贤, 等. Yes 相关蛋白 1 在胆囊癌组织中的表达及其临床意义[J]. 广西医学, 2018, 40(23): 2764-2766.
- [4] ADACHI Y, NOJIMA M, MORI M, et al. Insulin-like growth factor-1, IGF binding protein-3, and the risk of esophageal cancer in a nested case-control study[J]. World J Gastroentero, 2017, 23(19): 3488-3495.
- [5] 何睿, 汪洋, 黄颖滨, 等. Yes 相关蛋白 1 对胆囊癌细胞增殖及迁移的影响[J]. 中华肝胆外科杂志, 2017, 23(2): 95-99.
- [6] 肖颖. YAP1 调控间质成纤维细胞活化的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(8): 1703-1709.
- [7] 蒋庚西, 李春光, 赵铁军, 等. 沉默 Yes 相关蛋白 1 对人非小细胞肺癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(8): 1004-1008.
- [8] CAI Y X, FU X N, DENG Y. Histone demethylase JMJD1C regulates esophageal cancer proliferation via YAP1 signaling[J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(1): 115-124.
- [9] 李炯, 苏立, 李航. 非小细胞肺癌组织中 YAP1 和 FGFR1 蛋白表达水平及临床意义[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2018, 21(5): 493-497.
- [10] 许璐, 方玉松, 王丹云, 等. miR-200a 抑制 YAP1 基因表达对肺癌细胞增殖的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(7): 311-315.
- [11] FAN L, DONG X, ZHU H, et al. Abstract 5862: YAP1 mediated CDK6 activation confers radiation resistance in esophageal cancer: rationale for the combination of YAP1 and CDK4/6 inhibitors in EC[J]. Cancer Res, 2017, 77(13 Suppl): 5862-5867.
- [12] 周雅青, 杨蓉, 马刚. 沉默 YAP1 可抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(3): 286-291.
- [13] SONG S, XIE M, SCOTT A W, et al. A Novel YAP1 inhibitor targets CSCs-enriched radiation resistant cells and exerts strong antitumor activity in esophageal adenocarcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2018, 17(2): 443-454.
- [14] 高洁凡. DNA 损伤关卡蛋白 1 和 Yes 相关蛋白 1 在卵巢癌患者中的表达及与卵巢癌患者预后的相关性[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(12): 2747-2750.
- [15] 吴昌敬, 王蔚璐, 甄恩明, 等. YAP1 小干扰 RNA 对舌鳞状细胞癌生物学特性的影响[J]. 口腔医学研究, 2017, 33(12): 1278-1281.

(收稿日期: 2020-02-26 修回日期: 2020-06-29)